

**Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Falkai

**Der Einfluß des Retinoid-X-Rezeptors gamma auf die
Entstehung der Schizophrenie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rudolf Sperber

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Schuld

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2013

In Gedenken an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| A Zusammenfassung | 7 |
| B Einleitung | 8 |
| 1. Schizophrenie | 8 |
| 1.1 Definition | 8 |
| 1.2 Symptome und Einteilung | 8 |
| 1.3 Ätiologie | 9 |
| 1.4 Neuropathologie | 11 |
| 2. Genetik der Schizophrenie | 13 |
| 2.1 Studien der genetischen Epidemiologie | 13 |
| 2.1.1 Adoptionsstudie | 14 |
| 2.1.2 Zwillingsstudie | 15 |
| 2.1.3 Kopplungsstudie | 18 |
| 2.1.4 Assoziationsstudie | 19 |
| 2.2 Kandidatengene | 20 |
| 2.2.1 Funktionelle Kandidatengene | 20 |
| 2.2.2 Positionelle Kandidatengene | 22 |
| 3. Retinoidrezeptoren als Faktoren der Schizophrenie | 23 |
| 3.1 Chemische Struktur der Retinoide | 24 |
| 3.2 Retinoidrezeptoren | 25 |
| 3.3 Zusammenhang zwischen Retinoiden und Schizophrenie | 28 |
| 3.4 Retinoid-X-Rezeptor gamma | 31 |
| 3.4.1 Einfluß auf Störung des Arbeitsgedächtnisses | 31 |
| 3.4.2 Einfluß auf die Entstehung verschiedener Erkrankungen | 32 |
| 3.4.3 Lokalisation und Expression | 33 |
| C Fragestellung | 35 |
| D Material und Methoden | 36 |
| 1. Material | 36 |
| 1.1 Geräte | 36 |
| 1.2 Chemikalien | 37 |

| | |
|--|----|
| 1.3 Polymorphismen und Oligonukleotide | 38 |
| 2. Methoden | 38 |
| 2.1 Teilnehmer der Assoziationsstudie | 38 |
| 2.1.1 Kontrollgruppe | 38 |
| 2.1.2 Fallgruppe: Schizophrene Patienten | 38 |
| 2.2 Molekulargenetische Untersuchung | 39 |
| 2.2.1 Gewinnung von Genmaterial | 39 |
| 2.2.2 Polymerasekettenreaktion | 40 |
| 2.2.2.1 Ablauf der PCR | 40 |
| 2.2.2.2 Bedingungen der PCR | 42 |
| 2.2.3 Gelelektrophorese | 44 |
| 2.2.3.1 Prinzip der Gelelektrophorese | 44 |
| 2.2.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese | 45 |
| 2.2.4 Auswertung der untersuchten Polymorphismen | 46 |
| 2.2.4.1 SNP rs1467664 | 46 |
| 2.2.4.2 SNP rs2134095 | 50 |
| 2.2.5 Statistische Auswertung | 53 |
| E Ergebnisse | 54 |
| 1. Ergebnisse des SNP rs1467664 | 54 |
| 1.1 Allelverteilung | 54 |
| 1.2 Genotypverteilung | 54 |
| 2. Ergebnisse des SNP rs2134095 | 58 |
| 2.1 Allelverteilung | 58 |
| 2.2 Genotypverteilung | 59 |
| F Diskussion | 64 |
| 1. Diskussion der Methodik und Ergebnis der eigenen Studie | 64 |
| 2. Studien über RAR/RXR im Kontext der Schizophrenie | 67 |
| 3. Vergleich der Studien | 69 |
| 4. Studien über NRA4 im Kontext der Schizophrenie | 70 |
| 5. Studien über RXR gamma | 72 |
| 6. Fazit | 75 |

| | |
|-------------------------|-----|
| G Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| H Literaturverzeichnis | 82 |
| I Danksagung | 107 |
| J Lebenslauf | 108 |

A Zusammenfassung

Die Schizophrenie, eine psychiatrische Erkrankung mit stärksten Auswirkungen auf Wahrnehmung, Gedanken und Emotionen der Patienten, tritt weltweit bei etwa einem Prozent aller Menschen auf.

Ihre genaue Ursache ist bisher weitgehend ungeklärt. Neben Umweltfaktoren spielt die genetische Komponente eine herausragende Rolle, wobei nicht ein Gen alleine beteiligt ist, sondern ein Zusammenspiel verschiedener Gene als Auslöser vermutet wird.

Die Erforschung solcher Suszeptibilitätsgene kann zu besserem Verständnis der Ätiopathogenese der Erkrankung führen und schließlich zu neuen Ansätzen in Diagnose und Therapie.

Zahlreiche funktionelle Kandidatengene der Schizophrenie, allen voran der Dopaminrezeptor D2, unterliegen der Regulierung durch Retinoidrezeptoren, welche dadurch selbst zum Gegenstand der Forschung werden.

In vorliegender Arbeit wird das Gen des Retinoidrezeptor RXR gamma (RXRG-Gen) untersucht, das sich auf Chromosom 1q22-23 befindet.

In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit 287 Schizophreniepatienten und 421 gesunden Kontrollpersonen als Probanden werden zwei Einzelbasenaustausch-Polymorphismen – einer ist innerhalb der potentiellen Promotorregion lokalisiert, der andere befindet sich auf Exon 8 – auf einen Zusammenhang mit Schizophrenie untersucht.

Bei den Allel- und Genotypfrequenzen der Polymorphismen rs1467664 und rs2134095 zeigte sich keine signifikante Assoziation mit Schizophrenie, bei rs1467664 konnte der homozygote Genotyp des selteneren Allels Guanin im Vergleich zu den zusammengefaßten beiden anderen Genotypen einen Trend in Richtung Assoziation aufweisen.

Um eine Beteiligung des RXR gamma bei der Entstehung der Schizophrenie endgültig klären zu können, müßten noch andere Polymorphismen des Gens flächendeckend untersucht und ein stärkeres Augenmerk auf das Wechselspiel mit anderen Genen gelegt werden, da eine isolierte Betrachtung eines Gens innerhalb der Ätiologie einer so komplexen Erkrankung wie die der Schizophrenie zu wenig Aussagekraft hat.

B Einleitung

1. Schizophrenie

1.1 Definition

Die Schizophrenie bzw. schizophrene Psychose, die zur Hauptgruppe der endogenen Psychosen gehört, stellt eine der schwerwiegendsten Erkrankungen im Bereich der Psychiatrie dar. In ihrem Verlauf treten so unterschiedliche Symptome wie Wahn, Halluzinationen, Ich-Störungen, formale Denkstörungen sowie affektive und psychomotorische Störungen auf. Laut der Definition der DSM-IV müssen für die Diagnose der Schizophrenie kontinuierliche Anzeichen der Erkrankung von mindestens sechs Monaten vorliegen, eine Verschlechterung der gesellschaftlichen und beruflichen Funktionsfähigkeit vorhanden und ein affektives Syndrom oder eine organische Psychose ausgeschlossen sein. Wird die Dauer von sechs Monaten unterschritten, wird von einer schizophreniformen Störung gesprochen, liegt sie unter vier Wochen, handelt es sich um eine kurze reaktive Psychose oder eine psychotische Störung (American Psychiatric Association 2000).

1.2 Symptome und Einteilung

Die erste Unterteilung der Schizophrenie, die in vielfältiger Ausprägung unterschiedlichster Symptome und abweichenden Krankheitsverläufen ein sehr heterogenes Bild zeichnet, unternahm 1898 Emil Kraepelin, der von drei klinischen Subtypen ausging, der hebephrenen, der katatonen und der paranoid-halluzinatorischen „dementia praecox“, wie er die Schizophrenie nannte (Kraepelin 1896).

Die Einteilung der Symptome unternahm 1908 Eugen Bleuler, der zwischen Grund- und akzessorischen Symptomen unterschied. Zu ersteren zählen Störungen des formalen Denkens, der Affektivität und des Antriebs sowie Autismus, zu letzteren Halluzinationen, Wahn und katatone Symptome (Bleuler 1908).

Ein weiteres Konzept stammt von Kurt Schneider, bestehend aus Symptomen ersten

Einleitung

Ranges wie Gedankenentzug, -eingung und -lautwerden und Symptomen zweiten Ranges wie Affektveränderung, Wahneinfall und Ratlosigkeit (Schneider 1980).

In der modernen Psychiatrie ist die Einteilung in Positiv- und Negativsymptomatik von großer Bedeutung, weil sie in therapeutischem Kontext hinsichtlich der Beeinflussbarkeit der Symptome durch Psychopharmaka steht. So zeigen Neuroleptika auf positive Symptome wie Wahn und Halluzinationen eine stärkere Wirkung als auf Affektarmut und Antriebslosigkeit, die zur Negativsymptomatik zählen (Crow 1980). Weiter wird zwischen primären Negativsymptomen unterschieden, sogenannten intrinsischen, fundamentalen Symptomen, und sekundären, die eine Folge etwa der Medikation oder einer Depression sind (Tandon et al. 2009).

Die heutigen Klassifizierungen der schizophrenen Erkrankungen beruhen noch weitestgehend auf der Einteilung nach Kraepelin. Während das DSM-IV fünf Subtypen, den paranoiden und desorganisierten, zudem den katatonen, undifferenzierten und residualen Typ, kennt, unterscheidet das ICD-10 (International Classification of Diseases) zwischen sieben Ausprägungen: der paranoiden, katatonen und undifferenzierten Schizophrenie, dem hebephrenen Typ, der postschizophrenen Depression, dem schizophrenen Residuum und der Schizophrenia simplex (World Health Organisation 2006).

1.3 Ätiologie

Bei der Schizophrenie handelt es sich um eine Erkrankung multifaktorieller Ätiopathogenese. Es existieren unterschiedliche prädisponierende Faktoren, die sich wiederum zum Teil gegenseitig beeinflussen können. Hieraus entsteht eine „vorgeschiedigte“ Persönlichkeit erhöhter Vulnerabilität, bei der es durch den Einfluß späterer Stressoren zum Ausbruch der Krankheit kommen kann (Möller et al. 2000).

Eine zentrale Stellung als prädisponierender Faktor nimmt die *genetische Veranlagung* ein. Zudem spielen *hirnstrukturelle und neurologische Abweichungen* eine wichtige Rolle bei der späteren Ausbildung des Krankheitsbildes. *Umweltfaktoren* stellen sowohl einen

Einleitung

prädisponierenden Faktor als auch einen Stressor dar.

So gelten als entscheidende prädisponierende Umweltfaktoren prä- und perinatale Ereignisse.

Eine Fehlernährung im ersten Trimenon oder eine Influenzainfektion im zweiten Trimenon können die Entwicklung der Hirnstruktur beeinflussen (Woods 1998; Tsuang 2000).

Als Geburtskomplikationen kommen Traumata während der Wehen und Entbindung, aber auch Sauerstoffmangel in Frage, zudem bei hypoxisch-ischämischen Zuständen auch während der Schwangerschaft eine erhöhte Gefahr für Schizophrenie nachzuweisen ist (Jones et al. 1998; Zornberg et al. 2000; McNeil et al. 2000).

Ein Effekt einer Influenzavirusinfektion während der Schwangerschaft und auch noch in der frühen Kindheit wird diskutiert (Westergaard et al. 1999; Brown et al. 2004).

Obwohl das Alter der Mutter am meisten untersucht wurde, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Alter des Vaters und Erkrankungsrisiko des Kindes für Schizophrenie. Ist der Mann bei der Zeugung älter als 35, steigt das Risiko des Kindes statistisch um das 1,5 bis 3-fache (Wohl, Gorwood 2007, Tandon et al. 2008).

Ein weiterer Risikofaktor ist die Geburt und das Leben in städtischen Regionen. Es existieren hierbei zahlreiche Erklärungsversuche. So spielt das unruhigere Leben als psychosozialer Streßfaktor eine entscheidende Rolle. Allerdings können auch häufigere Infektionen während der Schwangerschaft und die größere Umweltbelastung zum höheren Risiko beitragen. Ein weiterer Grund kann der niedrigere durchschnittliche sozial-ökonomische Status in den Städten sein, da soziale Benachteiligung zur Zeit der Geburt und Kindheit an sich ein nachweisbares Risiko darstellt (Harrison et al. 2001).

Auch der Geburtsmonat scheint eine Auswirkung auf die Prävalenz der Schizophrenie zu haben (Abb. 01), wobei Menschen, die im Februar und März geboren werden, das größte Risiko haben, die im August und September geboren sind, das geringste (Mortensen et al. 1999).

Einleitung

Migration lässt sich als Risikofaktor unter Migranten der ersten und zweiten Generation nachweisen, wobei psycho-soziale Aspekte diskutiert werden (Cantor-Graae, Selten 2005).

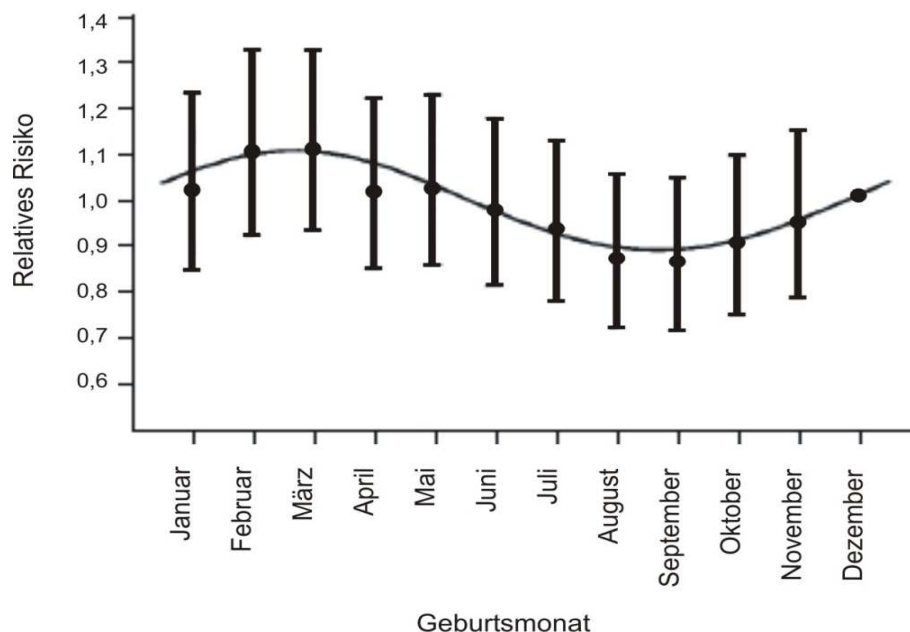


Abb. 01: Graphische Darstellung des relativen Risikos, an Schizophrenie zu erkranken, in Abhängigkeit zum Geburtsmonat (nach Mortensen et al. 1999)

1.4 Neuropathologie

Wright et al. verglichen in einer großangelegten Meta-Analyse mit über 1500 Patienten die *makroskopischen* Befunde von 58 Studien, die als bildgebendes Verfahren die Magnetresonanztomographie nutzten. Während die Hirnventrikel der an Schizophrenie Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe um 26% vergrößert waren, war das gesamte Hirnvolumen um etwa 2% verringert, die Amygdalae waren um 6%, der Hippocampus um 2-3% kleiner. Auch im Bereich der Basalganglien zeigten sich Unterschiede. Die Nuclei caudati waren 2% bzw. 4%, die Putamina 6% und die Globi pallidi 21% bzw. 24% größer. Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nicht ausgemacht werden (Wright

Einleitung

et al. 2000). In einer anderen Meta-Analyse zeigte sich zusätzlich eine signifikante Verkleinerung des Corpus callosum unter Schizophrenen (Woodruff et al. 1995).

Aktuellere Studien stützten diese Ergebnisse, da sie auch anhand von Magnetresonanztomographien verkleinerte Hirnvolumina und vergrößerte Ventrikel bei Schizophrenen nachweisen konnten (Steen et al. 2006).

Zudem ließen sich auch *histologische* Unterschiede nachweisen. Einige Studien ergaben kleinere Zellkörper der Pyramidalzellen im Hippocampus und Neokortex (Benes et al. 1991; Pierri et al 2001; Sweet et al. 2003). Es fanden sich darüber hinaus weniger dendritische Dorne und eine geringere dendritische Verzweigung (Black et al. 2004; Law et al 2004). Während hier keine Veränderung in der Anzahl der Neuronen zu erkennen war, besaß der Thalamus weniger Neuronen, vor allem im mediodorsalen Nucleus und Pulvinar (Highley et al. 2003), wobei die Ergebnisse hierbei widersprüchlich waren. Interessant war auch die verminderte Dichte an Interneuronen der immunoreaktiven Zellen, einhergehend mit reduzierter synaptischer Ausrichtung (Reynolds et al 2002). Außerdem waren weniger Oligodendrozyten zu finden, die zudem funktionell eingeschränkt waren (Uranova et al. 2004; Tkachev et al 2003).

Seit jeher besteht ein Streitpunkt hinsichtlich der Frage, ob der Prozeß, der solche Veränderungen hervorruft, im Zuge einer neuronalen Entwicklungsstörung abläuft, also prä-, perinatal und in der Kindheit, oder es sich hierbei um einen degenerativen Prozeß handelt und sämtliche Abweichungen erst ab dem Ausbruch der Erkrankung entstehen. Sogar Auswirkungen der Medikation der Patienten auf strukturelle Veränderungen des Gehirns werden diskutiert (Keshavan et al. 2008).

Vieles spricht für die Theorie einer früh einsetzenden Fehlentwicklung. So können, wie oben bereits erwähnt, Komplikationen in der Schwangerschaft oder Geburt mit einem erhöhten Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, in Verbindung gebracht werden. Auch pränatale Virusinfektionen weisen in diese Richtung. Bemerkenswert ist insbesondere, daß anatomische Anomalien des Kopfes, Gesichts, der Haut und der Haare sowie an Händen und Füßen, die Komplikationen des ersten und zweiten Trimenons zugerechnet

Einleitung

werden, bei Schizophreniepatienten gehäuft vorzufinden sind. Vor allem die Tatsache des späten Ausbruchs der Krankheit, dem im Nachhinein betrachtet oft frühe Anzeichen vorausgehen wie leichte Defizite in der Körper- und Gesichtsmotorik, Lernschwäche und verminderte soziale Fähigkeiten, spricht für frühzeitige Veränderungen der Hirnstruktur (Gourion et al. 2004). In aktuellen Studien konnten histologisch degenerative Prozesse während der Erkrankung nicht nachgewiesen werden, da an Post-mortem-Gehirnen von Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine fortgeschrittene Astrogliose erkennbar war (Falkai et al. 1999).

2. Genetik der Schizophrenie

Die Schizophrenie wird zu psychiatrischen Erkrankungen mit hoher genetischer Komponente gezählt, deren Anteil bei über 80% liegt (Sullivan et al. 2003).

Um die Pathogenese der Schizophrenie verstehen zu können, deren Ursachen vollständig zu enträtseln und eine adäquate Therapie entwickeln zu können, ist es unabdingbar, ihren genetischen Hintergrund genauer zu kennen. Während die Genforschung bei einzelnen genetischen Störungen wie der Huntington-Krankheit, bei der ein einzelnes Gen beteiligt ist, große Erfolge vorweisen kann, sind die Erkenntnisse bei so komplexen Störungen wie der Schizophrenie noch deutlich spärlicher. Charakteristisch für multifaktorielle Erkrankungen ist neben der Beteiligung zahlreicher Umweltfaktoren auch das Zusammenwirken verschiedener Gene. Erschwerend kommen bei der Schizophrenie, im Gegensatz etwa zu Diabetes oder der koronaren Herzerkrankung, beide ebenfalls multifaktorieller Ätiopathogenese, noch der unsichere Phänotyp und unbekannte Risikofaktoren hinzu (McDonald, Murphy 2003).

2.1 Studien der genetischen Epidemiologie

Während das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, weltweit einheitlich bei einem Prozent liegt, untersucht die genetische Epidemiologie mit genetischen-statistischen und molekular-epidemiologischen Methoden das Erkrankungsrisiko unter Verwandten unterschiedlichster Konstellationen oder innerhalb von Populationen. Dadurch können Rückschlüsse auf die Vererbung der Krankheit gezogen werden, um letztlich den

Einleitung

genetischen Einfluß auf die Schizophrenie gegenüber dem Einfluß der Umweltfaktoren herausarbeiten zu können (Dorak 2008).

In Familienstudien wird unter den Verwandten von an Schizophrenie erkrankten Patienten nach weiteren Krankheitsfällen gesucht. Die Ergebnisse zahlreicher Studien der letzten Jahrzehnte zeigen eine deutliche familiäre Häufung auf. So unterliegt ein Verwandter dritten Grades verglichen mit der Durchschnittsbevölkerung einem doppelt so hohem Risiko. Bei einem Verwandten zweiten Grades steigt es bereits auf etwa 5%. Bei Geschwistern und Kindern bewegt sich das Erkrankungsrisiko um die 10%. Ist mehr als ein Verwandter betroffen, sind etwa ein Geschwister- und ein Elternteil erkrankt, erhöht sich das Risiko bereits auf 17%. Als eineiiger Zwilling liegt die Wahrscheinlichkeit, ebenfalls an Schizophrenie zu leiden, bei nahezu 50% (Gottesmann 1991, Tandon et al. 2008).

Diese Studien scheinen die genetische Ähnlichkeit deutlich mit dem Krankheitsrisiko in Zusammenhang zu bringen; doch findet keine Abgrenzung zwischen genetischen und Umweltfaktoren statt, da sich sämtliche Familienmitglieder nicht nur die Genetik bis zu einem gewissen Grad teilen, sondern auch das familiäre Umfeld.

2.1.1 Adoptionsstudie

Eine gute Möglichkeit, den Effekt der gemeinsamen umweltbedingten Risikofaktoren zu minimieren, bietet die Durchführung von Adoptionsstudien. Man erhält Individuen, die genetisch verwandt sind, sich aber eine unterschiedliche Familienumwelt teilen.

Das erste Studiendesign dieser Art untersuchte 1966 in den USA Kinder an Schizophrenie erkrankter Mütter, die kurz nach der Geburt von gesunden Eltern adoptiert wurden, und verglich sie mit einer Gruppe adoptierter Kinder, deren leibliche Mütter psychiatrisch gesund waren. Während bei der Kontrollgruppe niemand an Schizophrenie erkrankte, lag bei ersteren der Prozentsatz bei 10,6%, was in etwa der Wahrscheinlichkeit entspricht, wären sie bei ihren leiblichen Müttern aufgewachsen

Einleitung

(Heston 1966). Dies deutet auf einen starken genetischen und gleichzeitig unbedeutenden Einfluß der Familienumwelt hin. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam zwei Jahre später eine dänische Studie, wobei die Erkrankungsrate der Fallgruppe mit fast 18% nahezu doppelt so hoch lag als die der Kontrollgruppe mit knapp über 10%. Selbst bei einer kleinen Gruppe innerhalb der Kontrollen, bei denen ein Adoptivelternteil an Schizophrenie erkrankt war, lag das Risiko bei unter 11% (Rosenthal, Kety 1968). In einer aktuelleren finnischen Studie lag die Erkrankungsrate der Fallgruppe bei 8,1% in signifikantem Unterschied zu 2,3% der Kontrollgruppe, wobei das Ergebnis deutlicher ausfällt, wenn die Anfälligkeit für andere psychotische und nicht-psychotische Störungen miteinbezogen wird (Tienari et al. 2003).

Ein anderes Studiendesign verglich die biologischen Verwandten von kranken und gesunden Adoptivkindern hinsichtlich ihres Erkrankungsrisikos, wobei erstere zu 15,8% und die Kontrollen nur zu 1,8% erkrankten, so daß auch diese Studie einen deutlichen genetischen Einfluß auf die Entstehung der Schizophrenie erkennen läßt (Kety 1983).

2.1.2 Zwillingsstudie

Eine weitere Methode, den jeweiligen Beitrag zur Entstehung der Schizophrenie von Genetik und Umwelt zu entwirren, stellt die Zwillingsstudie dar. Dabei wird der Prozentsatz der Übereinstimmung bei eineiigen Zwillingen mit dem von zweieiigen Zwillingen verglichen hinsichtlich der Erkrankung an Schizophrenie. Sind beide Teile eines Zwillingspaares erkrankt, gelten sie als konkordant, ist eines gesund, sind sie diskordant. Da monozygote Zwillinge das gleiche Erbgut besitzen, dizygote sich durchschnittlich die Hälfte der Chromosomen teilen, gibt der Vergleich der Konkordanzraten einen Hinweis auf die Größe der genetischen Komponente.

Sämtliche Zwillingsstudien der letzten Jahrzehnte kommen zu weitestgehend übereinstimmenden Ergebnissen. Die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen lagen um die 50%, die der zweieiigen bei knapp unter 10 bis zu 15% (Kendler 1993; McGuffin et al. 1984; Farmer et al. 1987). Zum deutlichsten Ergebnis kam eine norwegische

Einleitung

Studie 1991 unter Zugrundelegung der DSM-III-R-Kriterien mit Raten von 48.5% zu 4% (Onstad et al. 1991).

Einem Hauptkritikpunkt dieses Studiendesigns, daß eineiige Zwillinge etwa durch ihre Ähnlichkeit in höherem Maße das gleiche Umfeld teilen als zweieiige, begegnete eine Untersuchung von eineiigen Zwillingen, die nach der Geburt getrennt wurden. Doch konnte auch hier eine hohe Konkordanz von 58% ausgemacht werden (Gottesman 1991).

Obwohl all dies für einen starken Einfluß genetischer Risikofaktoren im Hinblick auf die Ätiologie der Schizophrenie spricht, deutet die Tatsache, daß die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen, die genetisch nahezu identisch sind, eben nicht bei 100%, sondern nur etwa halb so hoch liegt, auf die Relevanz auch anderer Faktoren hin.

Ein Grund könnte eine unterschiedliche pränatale, intrauterine Umwelt sein, da ca. ein Drittel aller monozygoten Zwillinge getrennte Embryonalhüllen innerhalb der gemeinsamen Plazenta besitzen (Sokol et al. 1995), was zu einer unterschiedlich guten Blutversorgung führen kann. Zudem werden unterschiedliche perinatale Komplikationen wie Traumata während der Wehen und der Entbindung diskutiert, die Einfluß auf die Hirnstruktur haben können (McNeil et al. 2000). Im Laufe des späteren Lebens schließlich spielen psychologische Stressfaktoren und weitere Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle.

Ein großer Einfluß der Genetik auf die Entstehung der Schizophrenie ist also offensichtlich. Die Aufgabe der Molekularbiologie ist es nun, das Zusammenspiel der Gene zu entschlüsseln, um das heterogene klinische Bild und das komplexe nicht-mendelianische Vererbungsmuster der Schizophrenie zu erklären.

Einfache Modelle, in denen ein Gen eine Krankheit auslöst, sind hierbei nicht anwendbar, auch wenn von *Polyphänie* (ein Gen verursacht mehrfache Veränderungen) einerseits und *unvollständiger Penetranz* (keine vollständige Ausprägung des Phänotyps trotz vorhandenen Genotyps) andererseits ausgegangen würde. Auch die Vorstellung

Einleitung

einer Kombination mehrerer Störungen, für die jeweils ein Gen verantwortlich ist, ist nicht zu halten. Vielmehr ist von komplexeren Modellen auszugehen, wobei verschiedene Gene beteiligt sind, entweder eine kleine Anzahl mit mittlerem Effekt, oder wahrscheinlicher, viele Gene mit jeweils nur geringem Einfluß, bezeichnet als *polygenes Modell* (O'Rourke et al. 1982; McGue et al. 1985; Risch 1990). Die Schizophrenie zeigt dabei *genetische Heterogenität*, wobei unterschiedliche Mutationen am gleichen Genort (Allel-Heterogenität) wie auch die Beteiligung multipler Gene an verschiedenen Genorten (Locus-Heterogenität) eine Rolle spielen. Die daraus entstehenden Kombinationsmöglichkeiten könnten die verschiedenen Phänotypen erklären. Genauso gut könnten im Gegenzug klinisch identische Fälle unterschiedlichst genetisch kodiert sein (Risch 1990). Wird das Phänomen der Epistase angenommen, was impliziert, daß sich die beteiligten Gene in ihrer Wirkung nicht in additiver Weise gegenseitig verstärken, sondern multiplikativ, können Gene mit minimalster Wirkung in Kombination erhebliche Effekte erzielen (McDonald, Murphy 2003; Cordell 2002).

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, der erfolgreiche Einsatz der Polymerasekettenreaktion und die Nutzung von Polymorphismusmarkern erleichtern die Suche nach Suszeptibilitätsgenen (Risikogenen), wobei zwischen zwei bedeutenden Herangehensweisen zu unterscheiden ist:

Zum einen existieren die sogenannten Kopplungsstudien, die innerhalb von Stammbäumen betroffener Familien nach Markern suchen, die häufiger bei erkrankten als bei gesunden Mitgliedern auftreten.

Im Gegensatz dazu werden in Assoziationsstudien eine Gruppe Gesunder mit einer Gruppe Erkrankter hinsichtlich der Allelverteilung bestimmter Marker verglichen, wobei unterschiedliche Ergebnisse hierbei auf eine Assoziation zwischen Gen und Erkrankung schließen lassen. Hierbei besteht keinerlei verwandtschaftliche Verbindung zwischen den teilnehmenden Personen.

2.1.3 Kopplungsstudie

In Kopplungsstudien werden Familien mit mehreren erkrankten Mitgliedern untersucht. Eine Kopplung tritt auf, wenn ein Krankheitsgen und ein Marker auf demselben Chromosom nahe aneinander liegen. Die deutlichsten Resultate werden erzielt, wenn es sich um ein Gen größeren Effektes handelt. Da dies beim polygenen Vererbungsmuster der Schizophrenie mit geringem Einfluß jedes beteiligten Genes nicht der Fall ist, waren die Ergebnisse bisheriger Kopplungsstudien häufig wenig aussagekräftig, was wohl auch auf die kleinen Gruppengrößen zurückzuführen war.

Die stärkste Kopplung aller Einzelstudien konnte auf Chromosom 1 (1q21-22) in einer kanadischen Studie ausgemacht werden (Brzustowicz et al. 2000), ein Locus der selbst zuvor schon in einer Studie einen Kopplungserfolg hatte (Kosower et al. 1995).

Weitere replizierbare Kopplungen gelangen auf 5q22-31 (Straub et al. 1997; Schwab et al. 1997), 6p24-22 (Schwab et al. 1995; Wang et al. 1995), 8p22-21 (Pulver et al. 1995), 10p11-22 (Schwab et al. 1998; Straub et al. 1998), 15q13-14 (Freedman et al. 1997; Liu et al. 1995), 18p11 (Schwab et al. 1998) und 22q11-13 (Moises et al. 1995; Gill et al. 1995), obwohl in diesen Regionen auch Studien mit abweichenden Ergebnissen vorliegen.

In den letzten Jahren wurden drei Meta-Analysen durchgeführt, die aufgrund unterschiedlicher Methoden zu teilweise abweichenden Ergebnissen kamen:

Während Lewis et al. auf der Suche nach Suszeptibilitätsgenen Signifikanz auf Chromosom 2q ausmachen konnten und immerhin starke Kopplung auf 1q, 3p, 5q, 6p, 8p, 11q, 14p, 20q und 22q (Lewis et al. 2003), kamen Badner und Gershon zu deutlichen Ergebnissen auf den Chromosomen 8p, 13q und 22q (Badner, Gershon 2002).

Diese beiden Meta-Analysen zeigen zwar Einigkeit hinsichtlich der Chromosomen 8p und 22q, weitere acht Regionen finden nur jeweils bei einer der beiden Studien Erwähnung; auch kann die bei Badner und Gershon wichtigste Region 2q bei Lewis et al. keinen Kopplungserfolg verzeichnen.

Die aktuellste Meta-Analyse von Ng et al. konnte signifikante Kopplung auf 2q

Einleitung

feststellen, weiterhin starke Kopplung auf 5q und wiederum auf 2q (Ng et al. 2009), zwei Chromosomen, bei denen Lewis et al. bereits deutliche Kopplungsergebnisse zeigen konnte. In separater Analyse derjenigen Studien mit ausschließlich europäischen Probanden konnte eine starke Kopplung auf 8p festgestellt werden, eine Region, die bei Badner und Gershon relevant war.

Diese Ergebnisse untermauern die Theorie, daß nicht ein Hauptgen mit sehr starkem Effekt, sondern eher verschiedene Gene mit moderatem Einfluß beteiligt sind. Des weiteren hat es den Anschein, daß Gene existieren, die zwar eine relativ starke Auswirkung haben, aber nur sehr selten in speziellen Gruppen zu finden sind.

2.1.4 Assoziationsstudie

Bei psychiatrischen Erkrankungen mit meist komplexer Genetik ist es sinnvoll, Gene, die sich in einer Region mit signifikanter Kopplung mit Schizophrenie befinden („positionelle“ Kandidatengene), anhand von Assoziationsstudien genauer zu untersuchen. Diese sind mit weniger Aufwand als Kopplungsstudien durchzuführen, da sie lediglich eines generellen genetischen Einflusses der Krankheit bedürfen und im Unterschied zu Kopplungsstudien die Häufigkeit eines bestimmten Markerallels bei voneinander unabhängigen Patienten untersucht und dabei mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wird (*population-based association study*). Da die Studie zudem sehr sensibel Gene mit geringer Effektgröße detektieren kann, ist sie geeignet für Erkrankungen auf polygener Vererbungsbasis (McDonald, Murphy 2003).

Ist die Häufigkeit eines Markerallels in der Fallgruppe größer als in der Kontrollgruppe, deutet dies darauf hin, daß dieses Allel entweder selbst ein Suszeptibilitätsallel darstellt oder in der Nähe eines solchen liegt, was als „linkage disequilibrium“, als Kopplungsungleichgewicht, bezeichnet wird. Der Abstand sollte weniger als 1cM betragen, da sonst ein „Crossing-over“ zwischen den entsprechenden Genen zu häufig wird (Berry et al. 2003).

Einleitung

In den letzten Jahren haben genomweite Assoziationsstudien (GWAS) an Bedeutung gewonnen. Hierbei können in großangelegten Fall-/Kontrollstudien mit Tausenden von Probanden über eine Million SNPs, verteilt über das ganze Genom, auf Assoziation getestet werden.

Shi et al. etwa konnten in einer Meta-Analyse aus drei GWAS mit zusammen über 27000 Probanden die Region 6p22.1 anhand von 7 SNPs signifikant mit Schizophrenie assoziieren (Shi et al. 2009).

Steffanson et al. konnten im selben Jahr in einer groß angelegten genomweiten Assoziationsstudie die loci 6p21.3-22.1, 11q24.2 und 18q21.2 signifikant mit Schizophrenie in Verbindung bringen (Steffanson et al. 2009).

Nahezu 30000 Probanden wurden in einer neueren Meta-Analyse aus 19 GWAS eingeschlossen. Anfangs wurden über 1250000 SNPs untersucht, im zweiten Teil der Studie wurden die aussichtsreichsten 81 Polymorphismen weiter überprüft. Hierbei konnten neben zwei bekannten Loci (6p21.32-p22.1, 18q21.2) fünf neue (1p21.3, 2q32.3, 8p23.2, 8q21.3, 10q24.32-q24.33) mit Schizophrenie assoziiert werden (Ripke et al. 2011).

Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen rs1467664 und rs2134095 auf 1q22-23 zeigten in bisherigen GWAS, die sich mit Schizophrenie beschäftigten, keine relevanten Ergebnisse.

2.2 Kandidatengene

Von positionellen sind funktionelle Kandidatengene zu unterscheiden, die aus der Überlegung hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Wirkungsweise resultieren und nicht auf einem positiven Kopplungsergebnis beruhen müssen.

2.2.1 Funktionelle Kandidatengene

Ausgangspunkt zahlreicher Studien ist die klassische Dopaminhypothese, die von einer erhöhten Konzentration an Dopamin ausgeht und von der Beobachtung gestützt wurde, daß die Potenz der Neuroleptika der ersten Generation mit der Fähigkeit zur Blockierung

Einleitung

der Dopamin-D2-Rezeptoren korreliert (Kapur et al. 1996). Es konnten insgesamt fünf Dopaminrezeptoren isoliert werden, wobei der Dopamin-D3-Rezeptor (DRD3) als erster mit Schizophrenie näher in Verbindung gebracht werden konnte. Bei einem Single-Nucleotide-Polymorphismus (SNP) mit der Variation Ser-9-Gly in Exon 1 des DRD3-Gens (3q13.3) konnten in einer Meta-Analyse mit über 5300 Teilnehmern (Williams et al. 1998) bisherige signifikante Assoziationen der homozygoten Allele bestätigt werden (Spurlock et al. 1998). In neueren Meta-Analysen aus China und Japan konnte wiederum bei demselben SNP keine Assoziation festgestellt werden (Ma et al. 2008, Utsunomiya et al. 2008).

Ebenfalls in einer Meta-Analyse konnte der schon lange als Suszeptibilitätsgen behandelte DRD2 erfolgreich mit Schizophrenie assoziiert werden; das Cys-Allel des Cys-311-Ser-Polymorphismus zeigte sich hoch signifikant (Glatt et al. 2003). Zwei aktuelle chinesische Studien konnten anhand zweier SNPs (rs1076560, rs6277) einen Zusammenhang des DRD2 mit Schizophrenie bestätigen (Zengh et al. 2012, Fan et al. 2010).

Neuere komplexere Betrachtungsweisen sehen neben einer erhöhten dopaminergen Weiterleitung in den Basalganglien, welche eine akute Psychose auslöst, gleichzeitig auch einen Mangel an Dopamin im präfrontalen Kortex, was zu Einschränkungen kognitiver Fähigkeiten führt (erweiterte Dopaminhypothese) (Kirov et al. 2005). Wirkung auf den Dopaminhaushalt in dieser Region wird vor allem dem Gen zugerechnet, welches Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) kodiert. Da es sich zudem auf Chromosom 22q11 und somit innerhalb der Region befindet, die in beiden großen Meta-Analysen Kopplung mit Schizophrenie zeigte, stellt es sich auch als vielversprechendes positionelles Kandidatengen dar. In einer groß angelegten Assoziationsstudie unter aschkenasischen Juden konnte es bereits erfolgreich mit Schizophrenie assoziiert werden, obwohl speziell der SNP Val-158-Met in Exon 4, der schon Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen gab, nur moderaten Effekt zu haben scheint (Shifman et al. 2002).

Neben Dopamin erweist sich Glutamat als der Neurotransmitter, der am meisten mit

Einleitung

Schizophrenie in Verbindung gebracht werden kann (Harrison, Weinberger 2005). Auf Chromosom 7q21-22 befindet sich GRM3 (Metabotropic Glutamate Receptor 3), der erstmalig in einer deutschen Studie signifikant assoziiert werden konnte. Obwohl dies innerhalb derselben Studie nicht zu replizieren war (Martí et al. 2002), konnte in Japan ein anderer SNP, ebenfalls auf Exon 3, mit Schizophrenie in Verbindung gebracht werden (Fuji et al. 2003). Letztlich konnte eine amerikanische Studie die bisherigen positiven Funde zumindest anhand positiver Trends bestätigen, zusätzlich durch eine signifikante Assoziation eines SNPs auf Intron 2 und von Haplotypen, basierend auf den bisherigen Funden, die Stellung von GRM3 als wichtiges Kandidatengen festigen (Egan et al. 2004).

Die Erkenntnisse über den Wirkstoff LSD, der schizophrene Episoden hervorrufen kann, indem er den körpereigenen Botenstoff Serotonin imitiert, und zudem die Erfolge in der Pharmakotherapie durch neuere sogenannte atypische Antipsychotika, die starken Einfluß auf den Serotoninhaushalt haben, prädestinieren diejenigen Gene, die die serotonerge Reizweiterleitung betreffen, als funktionelle Kandidatengene, wobei hier das 5HT_{2A}-Rezeptorgen auf Chromosom 13q im Mittelpunkt der Forschungen steht. Nach wechselhaften Erfolgen konnte 1997 in einer Meta-Analyse mit über 3000 Personen eine signifikante Assoziation der Homozygoten einer T-102-C-Mutation und Schizophrenie ausgemacht werden (Williams et al. 1997), was 2004 in einer weiteren, noch umfangreicheren Meta-Analyse weitestgehend Bestätigung fand (Abdolmaleky et al. 2004).

2.2.2 Positionelle Kandidatengene

Das Dysbindin-Gen alias *dystrobrevin binding protein 1* (DTNBP1) befindet sich auf der Kopplungsregion auf Chromosom 6p22.3. Erstmals konnten Straub et al. positive Ergebnisse innerhalb einer Assoziationsstudie vorweisen (Straub et al. 2002), eine große Studie aus Deutschland kam später zu ähnlichen Resultaten (Schwab et al. 2003). Eine weitere deutsche Assoziationsstudie von 2010 konnte keinen Zusammenhang zwischen DTNBP1 und Schizophrenie zeigen (Strohmaier et al. 2010).

Einleitung

Neuregulin 1 (NRG 1) gilt seit einer isländischen Studie an 110 Schizophrenen aus 33 Familien als Kandidatengen. Die genomweite Kopplungsstudie zeigte deutliche Erfolge auf Chromosom 8p12-21. Anschließende Identifizierung zahlreicher SNPs auf diesem Gen und Verwendung dieser in Haplotyp-Assoziationsanalysen bestätigten die Relevanz dieses Gens (Stefansson et al. 2002). Eine Verknüpfung mit dem funktionellen Einfluß dieses Gens auf der Basis der sogenannten NMDA-Hypofunktions-Hypothese konnte mittels Neuregulin-1-Knockout-Mäusen hergestellt werden, deren aktive NDMA-Rezeptoren reduziert waren (Rujescu 2010).

Ein vielversprechendes Ziel zahlreicher Forschungen ist RGS4 (Regulator of G-protein signaling 4). In den post-mortem-Hirnen Schizophrener zeigte es sich als das einzige Transskript, das durchgängig reduziert war (Mirnics et al. 2001). Es befindet sich auf Chromosom 1q21-22, ein Locus mit der stärksten Kopplung aller Einzelstudien (Brzustowicz et al 2000). Seitdem Chowdari et al. Assoziation eines Haplotypen dieses Gens mit Schizophrenie darstellen konnten (Chowdari et al 2002), wurde man in weiteren Studien fündig (Chen et al. 2004; Morris et al. 2004). Neuere Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen; so finden Réthelyi et al. keinen Zusammenhang zwischen Polymorphismen des RGS4 und Schizophrenie (Rethelyi et al. 2010), So et al. können einen Haplotypen aus 4 SNPS von RGS4 mit der Erkrankung assoziieren (So et al. 2008).

Darüber hinaus scheint RGS4 in die Modulation relevanter Transmittersysteme wie Dopamin- oder Serotoninrezeptoren involviert zu sein (Harrison, Weinberger 2005).

3. Retinoidrezeptoren als Faktoren der Schizophrenie

Anhand der Tatsache, daß Dopamin-Rezeptoren unter starker neuromodulatorischer Kontrolle anderer Rezeptorsysteme stehen (Meltzer 1991) und die indirekte Beeinflussung des D2-Rezeptors in der Pharmakotherapie gegenüber des Blockierens des Dopamin-Rezeptors mittlerweile im Vordergrund steht (Citver et al. 2002), erscheint die genauere Betrachtung des Retinoid-Rezeptors, der deutlichen Einfluß auf die Transkription des D2-Rezeptors zeigt, als wichtig.

3.1 Chemische Struktur der Retinoide

Der ursprüngliche chemische Aufbau eines Retinoids umfaßt einen β -Ionen-Ring, eine mehrfach ungesättigte Kette als Mittelteil und eine polare funktionelle Gruppe. In den letzten Jahren wurden zahlreiche synthetische Derivate entwickelt, die sich stark von der ursprünglichen Form entfernten. Der Ring wurde durch mehrfach hydrophobe Gruppen ersetzt oder die Kette mit aromatischen Ringen versehen. Doch obwohl auch die funktionelle Gruppe starken Veränderungen unterlag, bleibt die Gemeinsamkeit eines amphiphatischen Charakters erhalten, der seinen Grund im lipophilen Baustein und hydrophilen Terminus hat (Nau, Blaner 1999).

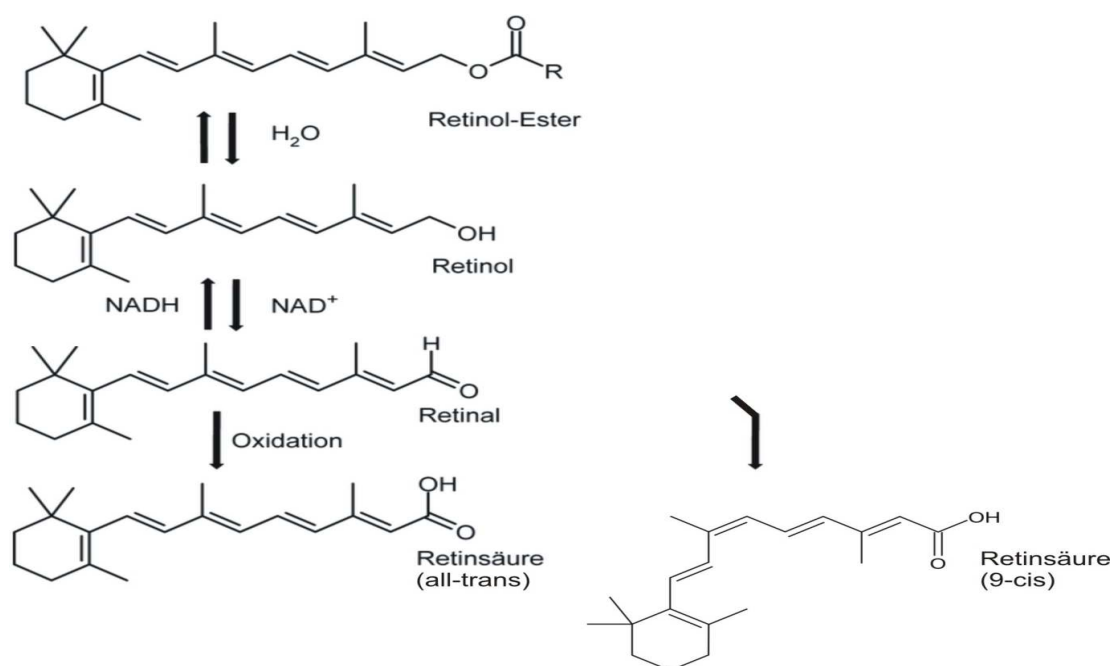


Abb. 02: Reaktionskette mit Retinsäuren als Endprodukte

Die wichtigsten natürlichen Vertreter sind Retinol (Syn.: Vitamin A, Vitamin-A-Alkohol), Retinal (Syn.: Vitamin-A-Aldehyd) und Retinsäure (Vitamin-A-Säure). Alle Arten von Retinoiden werden vom Organismus entweder aus tierischer Nahrung direkt als Retinol oder aus pflanzlicher Kost als Provitamin A aufgenommen. Letzteres gehört zur Gruppe der Carotinoide wie etwa das β -Carotin, welches in vivo mithilfe einer Dioxigenase erst

Einleitung

in zwei Moleküle Retinal gespalten werden muß. Anschließend kann es wieder zu Retinol reduziert zu werden, um in der Leber, aber auch im Fettgewebe ungeachtet seiner diätetischen Herkunft gespeichert zu werden. Vorher muß es noch mit langkettigen Fettsäuren verestert werden, meist zu Retinolpalmitat (Blaner et al. 1994). Retinoide wirken in vivo innerhalb einer komplexen genetischen Kaskade. An deren Beginn steht eine Reaktionsabfolge mit den Retinsäuren als Endprodukten, Morphogenen, die als Ligand etwa von Retinoidrezeptoren starken Einfluß auf die Transkription zahlreicher Zielgene nehmen können (Mangelsdorf, Evans 1994). Innerhalb dieser Abfolge bewirkt die Lipoproteinlipase (LPL) die reversible Hydrolyse von Retinylester in Retinol, vor allem bei Retinololeat und -palmitat. Der nächste Schritt, die reversible Umwandlung von Retinol in Retinal, katalysiert durch Alkoholdehydrogenasen, gilt als Schrittmacherreaktion, wobei Retinol sowohl in der 11-cis, als auch in der All-trans-Konfiguration umgesetzt werden kann (Chen et al. 1995). Zusätzlich kann auch eine Isomerase-katalysierte Umwandlung zwischen den Konfigurationen untereinander stattfinden. Die Aldehyddehydrogenase (ALDH) wiederum oxidiert Retinal zu Retinsäure, was den irreversiblen Schritt in dieser Reaktionsfolge darstellt, wobei als Endprodukte All-trans- und 9-cis-Retinsäure entstehen. Unter Anwesenheit von Cytochrom-450-Enzymen kann zudem eine Degradierung der Retinsäure stattfinden, indem sie weiter oxidiert wird.

3.2 Retinoidrezeptoren

Entscheidende Moleküle innerhalb der Retinoidkaskade sind die nuklearen Retinoidrezeptoren. Als DNA-bindende Proteine gehören sie zur „großen Familie“ der nuklearen Hormonrezeptoren, welche nach Aktivierung durch verschiedene Liganden wie Steroide, Thyroidhormone, Vitamin D oder eben Retinoide an spezifische Stellen der DNA binden und die Transkription regulieren (Kumar, Thompson 1999).

Es gibt zwei Typen von Retinoidrezeptoren: die *retinoic acid receptors* (RARs) *alpha*, *beta* und *gamma* und die *retinoid X receptors* (RXRs) *alpha*, *beta* und *gamma*, welche jeweils auf unterschiedlichen Genen codiert sind, was ihre unterschiedlichen Aufgaben

Einleitung

innerhalb des biologischen Prozesses zeigt: die RARs finden sich auf den Chromosomen 17q12 (RAR alpha), 3p24 (RAR beta), 12q13 (RAR gamma), die drei RXRs auf 9q34 (RXR alpha), 6p21.3 (RXR beta) und 1q22-23 (RXR gamma). Während die RARs sowohl All-trans-, als auch 9-cis-Retinsäure als Ligand besitzen, binden die RXRs nur an 9-cis-Retinsäure (Heyman et al. 1992). Als Grund hierfür zeigt sich die ausgeprägtere Krümmung der Ligandenbindungstasche, der Andockstelle, der RXRs, wofür die geradlinigere Geometrie der All-trans-Retinsäure nicht geeignet ist (Egea et al. 2000).

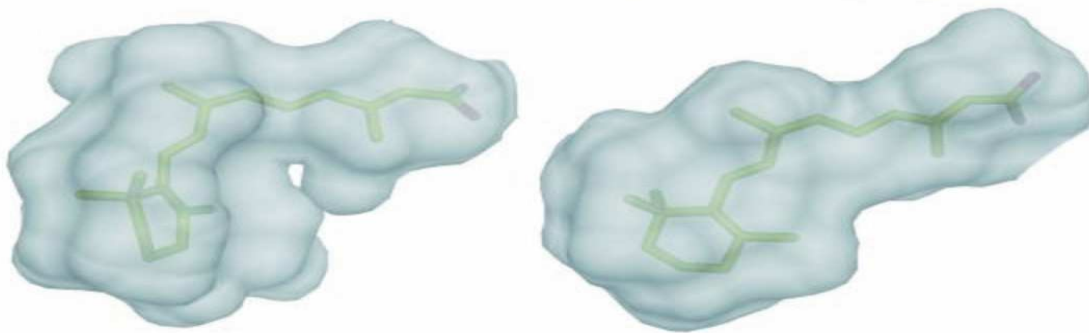


Abb. 03: Geometrie der Ligandenbindungstaschen (Egea et al. 2000)

Weitere Unterschiede ergeben sich daraus, daß die RARs als wichtigste Vitamin-A-Rezeptoren auch alleine agieren können, die RXRs hingegen meist nur innerhalb eines heterodimeren Komplexes funktionieren. Diese „Partnerschaft“ können sie mit zahlreichen nuklearen Hormonrezeptoren eingehen, wie zum Beispiel mit NURR1 (*nuclear-related factor 1*) und den PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*), die auch 9-cis-Retinsäure als Ligand nutzen, oft findet man sie aber in Kombination mit den RARs. Solche heterodimeren Komplexe sind wesentlich stabiler und können effizienter an ihre jeweiligen DNA-Erkennungssequenzen, sogenannte *retinoic acid response elements* (RAREs), binden als etwa RARs (bzw. RXRs an RXREs) alleine (Zhang et al. 1992).

Dort, innerhalb der Promotorregion der jeweiligen Zielgene, sind sie in der Lage, über einen komplexen Mechanismus die Transkription zu regulieren (Abb. 04):

Repression: In Abwesenheit einer passenden Retinoidsäure als Ligand binden spezielle Co-Repressoren an den RAR-RXR-Komplex wie zum Beispiel *nuclear receptor co-repressor* (N-CoR) oder *silencing mediator of retinoid and thyroid receptor* (SMRT),

Einleitung

worauf sich Histon-Deacetylasen (HDACs) anlagern können, welche durch eine Verdichtung (Kondensation) des Chromatins die Transkription verhindern (Citver et al. 2002; Clarke et al. 2004).

Derepression: Erst die Bindung eines Liganden führt zur Entfernung des HDAC-Komplexes und Anlagerung von Koaktivatoren der Histon-Acetyltransferase (HAT) wie p160 und CREB (cAMP response element-binding) -binding protein (CBP), was die Dekondensation des Chromatins durch Acetylierung der Histone bewirkt (Citver et al. 2002; Clarke et al. 2004).

Die *Aktivierung* und Beschleunigung der Transkription bewirkt die Bindung des RNA-Polymerase-II-Holoenzym in Verbindung mit dem TATA-bindenden Protein (TBP), TBP-assoziierte Faktoren (TAFs) und Mediatorkomplexe (Meds) (Clarke et al. 2004).

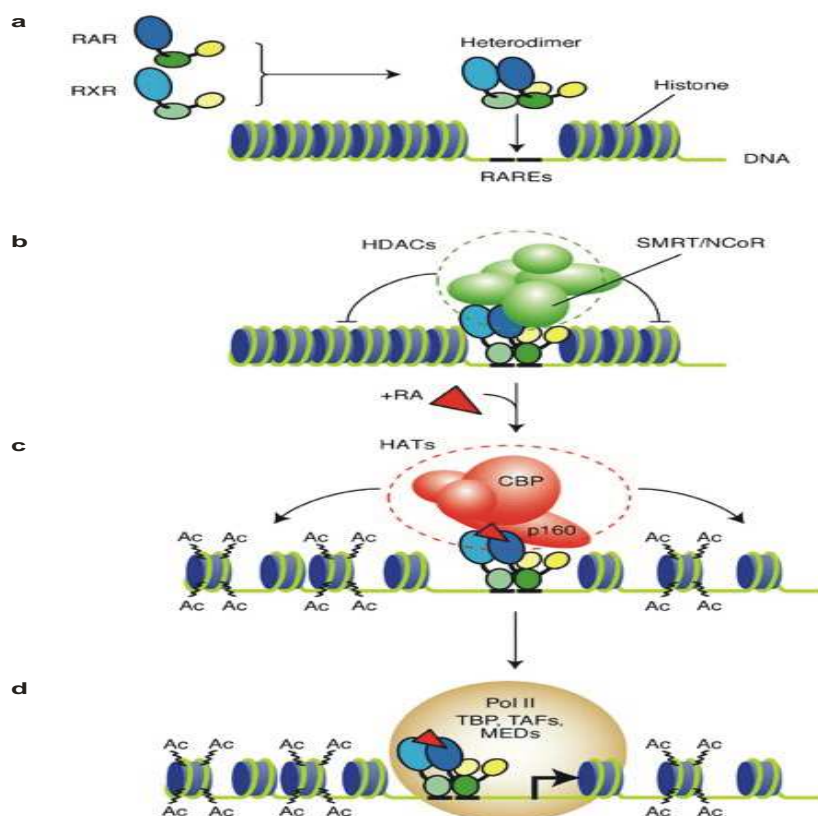


Abb. 04: Wirkungsweise eines heterodimeren RAR-RXR-Komplexes (Clarke et al. 2004): a: Andockung an DNA-Sequenz, b: Repression, c: Derepression, d: Aktivierung der Transkription

Einleitung

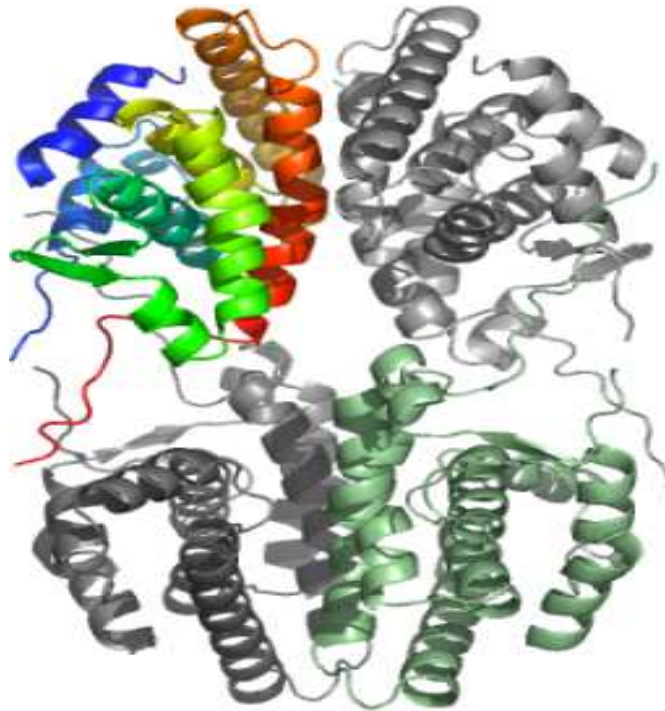


Abb. 05: Dreidimensionale, polychromatische Darstellung eines Retinoidrezeptors (Structural Genomics Consortium 2010)

Als bekanntes Beispiel für die wichtige Rolle der Retinoide innerhalb der Physiologie des menschlichen Organismus ist die Nachtblindheit als Folge von Vitamin-A-Mangel zu nennen, was auf den großen Einfluß auf die Funktion der Retina zurückzuführen ist. Weitere deutliche Auswirkungen auf zentrale Abläufe wie die der Embryonalentwicklung, Entzündungen, Knochenwachstum, Reifung und Differenzierung von Epithelzellen oder Talgproduktion zeigen die Bedeutung der Retinoide genauso wie größere Infektionsanfälligkeit und erhöhter Gefahr zur Ausbildung bösartiger Tumore bei Vitamin-A-Mangel (Love, Gudas 1994).

3.3 Zusammenhang zwischen Retinoiden und Schizophrenie

Es existieren unterschiedliche Hinweise darauf, daß eine Fehlregulierung von Retinoiden eine wichtige Rolle in der Entstehung der Schizophrenie spielt:

a) Viele Symptome, die sich in Folge von Vitamin-A-Mangel oder -Vergiftung zeigen,

Einleitung

ähneln denen der Schizophrenie: Denkstörungen und geistiges Defizit, anatomische Anomalien des Gehirns wie vergrößerte Ventrikel, Nichtanlage des Corpus callosum oder Mikrozephalie, wie auch verschiedene angeborene Mißbildungen, häufig im craniofazialen Bereich und an den Fingern (Goodman 1996).

b) Es finden sich zahlreiche Übereinstimmungen von Loci, die sowohl positive Ergebnisse hinsichtlich der Kopplung mit Schizophrenie aufweisen als auch Gene beherbergen, die wichtige Faktoren innerhalb der Retinoidkaskade kodieren (Goodman 1998).

Tab. 01: Loci als Schnittstellen der Retinoidkaskade und Schizophrenie

| Locus | Retinoid-Gen | Schizophrenie-Studie |
|----------|----------------|--|
| 1q21 | CRABP2 | Kopplungsstudie (1q21-22) (Brzustowicz et al. 2000) |
| 1q22-23 | RXR gamma | Zytogenetische Studie (Kosower et al. 1995) |
| 3q21-q22 | RBP1 | Assoziations- studie (rs893703) (Kirov et al. 2009) |
| 3p24 | RARbeta, PPAR | Kopplungsstudie (3p24-26) (Pulver et al. 1995) |
| 6p21.3 | RXR beta, CYP2 | Assoziationsstudie (6p21.3-22.1) (Stefansson et al 2009) |
| 8p22 | LPL | GWA-Studie (Deletion) (Need et al. 2009) |
| 12q24 | ALDH2 | QTL-Studie (Lien et al. 2010) |

Einleitung

| | | |
|--------------|-------------------|---|
| 17q21 | RAR α | Kopplungsstudie (Escamilla et al. 2009) |
| 18q11.2-12.1 | TTR | Assoziationsstudie (Trend) (Muratake et al. 2005) |
| 22q12-13.1 | PPARalpha, CYP2D6 | Kopplungsstudie (Pulver et al. 1994) |

c) Für einen großen Einfluß der Retinoide auf die Pathogenese der Schizophrenie spricht vor allem die Tatsache, daß unter den Zielen der Vitamin-A-Regulierung sich häufig Kandidatengene der Schizophrenie befinden.

Im Zentrum der Überlegungen ist die Regelung der Transkription des Dopaminrezeptors D2. So konnte in vitro in Hypophysenzellen nach Zugabe von Retinsäure ein 30faches an D2-mRNA gemessen werden und innerhalb der D2-Promoterregion die Existenz eines *retinoic acid response element* (RARE), an den RAR-RXR-Heterodimere binden, nachgewiesen werden (Samad et al. 1997). Zudem konnte in vivo gezeigt werden, daß Mäuse, die jeweils durch einfache oder doppelte Mutation bestimmte RARs oder RXRs nicht exprimieren, teils deutlich weniger D2-mRNA produzieren, wobei der Effekt bei Doppelmutanten größer als bei Einfachmutanten war. Die Bandbreite reichte von einer Reduzierung von 3% bei Fehlen von RXR beta bis zu 70% bei gleichzeitiger Abwesenheit von RAR beta und RXR gamma (Samad et al. 1997).

In einer weiteren Studie wurde an Mäusen der Zusammenhang von eingeschränkter Fortbewegung, Dopaminhaushalt und Abwesenheit bestimmter Retinoidrezeptoren untersucht. Dabei zeigte sich an RAR beta/RXR beta-, RAR beta/RXR gamma- und RXR beta/RXR gamma-Null-Mutanten neben diverser motorischer Defekte unterschiedlicher Ausprägung eine 30-40%ige Reduktion von D1- und D2-Rezeptortranskription innerhalb des gesamten Striatum, wobei diese Abnahme im ventromedialen Bereich, der zum dopaminergen mesolimbischen System gehört, im Vergleich zum ventro- und

Einleitung

dorsolateralen Bereich um 50-80% verstärkt war (Krezel et al. 1998). Da die Anzahl der dopaminexprimierenden Nervenzellen trotz der Abwesenheit der Retinoidrezeptoren nicht reduziert war, scheinen die Retinoidrezeptoren keinen Einfluß auf die Entstehung von Striatumzellen zu haben, können diese aber auf der Basis der Transkription kontrollieren. Daß in manchen Bereichen des Striatum kein Effekt erzielt wurde, obwohl die beteiligten Retinoidrezeptoren bei Wild-Typ-Mäusen im gesamten Striatum exprimiert werden, deutet auf die Beteiligung noch anderer relevanter Faktoren zur Steuerung des Dopaminhaushalts hin (Krezel et al. 1998).

Weitere Ziele retinoider Regulierung sind unter anderem Serotoninrezeptoren wie der 5HT-Rezeptor, Glutamatrezeptoren, Nikotinrezeptoren, NMDA-Rezeptoren, ACholinacetyltransferase, Phospholipase A2, Tau, die Interleukinrezeptoren alpha und beta, Oxytozin, Proteinkinase C, Neurofilament 66 und light, Opioidrezeptor delta und das Amyloid precursor protein (Goodman 1998).

3.4 Retinoid-X-Rezeptor gamma

Die Erkenntnisse aus den Tierversuchen von Samad et al. und Krezel et al. zeigen einen möglichen Einfluß von RXR gamma auf die Entstehung von Schizophrenie über die Veränderung des Dopaminhaushalts (Samad et al. 1997, Krezel et al. 1998), was weitere Untersuchungen in diese Richtung interessant erscheinen lassen.

3.4.1. Einfluß auf Störung des Arbeitsgedächtnisses

Zwei europäische Studien konnten in Tierversuchen Störungen von Lern- und Gedächtnisprozessen des räumlichen Denkens (Cocco et al. 2002) und Defizite des Vergleichsgedächtnisses bei Mäusen (Etchamendy et al. 2003) mit Vitamin-A-Mangel in Verbindung bringen. Schon 1998 wies eine amerikanische Studie bei Null-Mutanten-Mäusen, bei denen die Retinoidrezeptoren RAR beta und RXR gamma deaktiviert wurden, Defizite des räumlichen Langzeitgedächtnisses nach (Chiang et al. 1998).

Darüber hinaus untersuchte eine französische Studie den Effekt der Deaktivierung von RAR beta und RXR gamma mit Hilfe von Null-Mutanten-Mäusen auf das

Einleitung

Arbeitsgedächtnis (Wietrych et al. 2005). Dabei zeigten nicht nur die Doppel-Null-Mutanten deutliche Defizite des räumlichen Arbeitsgedächtnisses in verschiedenen Labyrinth-Tests, sondern in gleicher Weise RXR gamma-Null-Mutanten, während die RAR beta-Null-Mutanten keine Einbußen erlitten.

Zudem beinhaltet dieselbe Studie immunhistologische Untersuchungen. Diese zeigen nicht nur die Expression von RXR gamma im Hippocampus und bestätigen damit vorangegangene Untersuchungen (Zetterström et al. 1999), sondern können RXR gamma innerhalb neuer Regionen ausmachen, vor allem im infra- und prälimbischen Cortex, welcher als medialer präfrontaler Cortex wichtige Verschaltungen mit anderen kortikalen und subkortikalen Regionen besitzt (Uylings et al. 2003). Auch findet sich RXR gamma im perirhinalen Cortex, als Teil der parahippocampalen Bahn wichtige Quelle afferenter Sensorik zum Hippocampus.

Die Lokalisation des Retinoidrezeptors RXR gamma in zentralen Hirnbereichen wie Hippocampus und präfrontalem Cortex, wie auch die entstandenen Defizite des Arbeitsgedächtnisses durch dessen Deaktivierung, machen den Retinoidrezeptor RXR gamma zum Kandidaten für weitere Untersuchungen, speziell im Zusammenhang mit Schizophrenie, einer Erkrankung, bei der eine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses ein zentrales Merkmal kognitiver Störungen darstellt (Goldman-Rakic 1994; Wolf 2006).

3.4.2. Einfluß auf die Entstehung verschiedener Erkrankungen

Obwohl RXR gamma als Kandidat zur Entstehung kognitiver Störungen relevant erscheint, lag der wissenschaftliche Schwerpunkt bisher meist auf anderem Gebiet. So wurden etwa Assoziationsstudien unternommen, die den Einfluß des RXR gamma auf den Glucosestoffwechsel, in Folge dessen auf die Entstehung von Typ-2-Diabetes, Diabetischer Nephropathologie und Diabetischer Retinopathie untersuchten (Wang et al. 2002, Hsieh et al. 2006).

Einleitung

Daneben wurde ein Zusammenhang zwischen RXR gamma und der Ätiologie der Peripheren Schilddrüsenhormonresistenz vermutet (Romeo et al. 2004).

3.4.3. Lokalisation und Expression

Das Gen des Retinoid-X-Rezeptors gamma (GeneID: 6258) befindet sich auf Chromosom 1, welches als größtes menschliches Chromosom um die 247 Millionen Basenpaare enthält, was in etwa 8 Prozent der menschlichen DNA entspricht. Es beherbergt über 3000 bis zu 25000 Gene des Menschen. Auf ihm befinden sich darüber hinaus über 955000 Single-Nucleotid-Polymorphismen.

Die zytogenetische Bezeichnung des Genlocus ist 1q22-23, die 22. und 23. Bande auf dem langen Arm des Chromosom 1. Hinsichtlich der genauen molekularen Position erstreckt er sich von Basenpaar (bp) 163636974 bis 163681054. Das Gen besitzt somit eine Größe von 44080 bp (NCBI, Entrez Gene 2005).

Während RXR alpha in Leber, Niere, Epidermis und Verdauungstrakt exprimiert wird, RXR beta weit verteilt im ganzen Organismus zu finden ist, beschränkt sich die Expression von RXR gamma auf Muskel, Hypophyse und Teilen des Gehirns (The GeneCards Human Gene Database 2011).

Einleitung

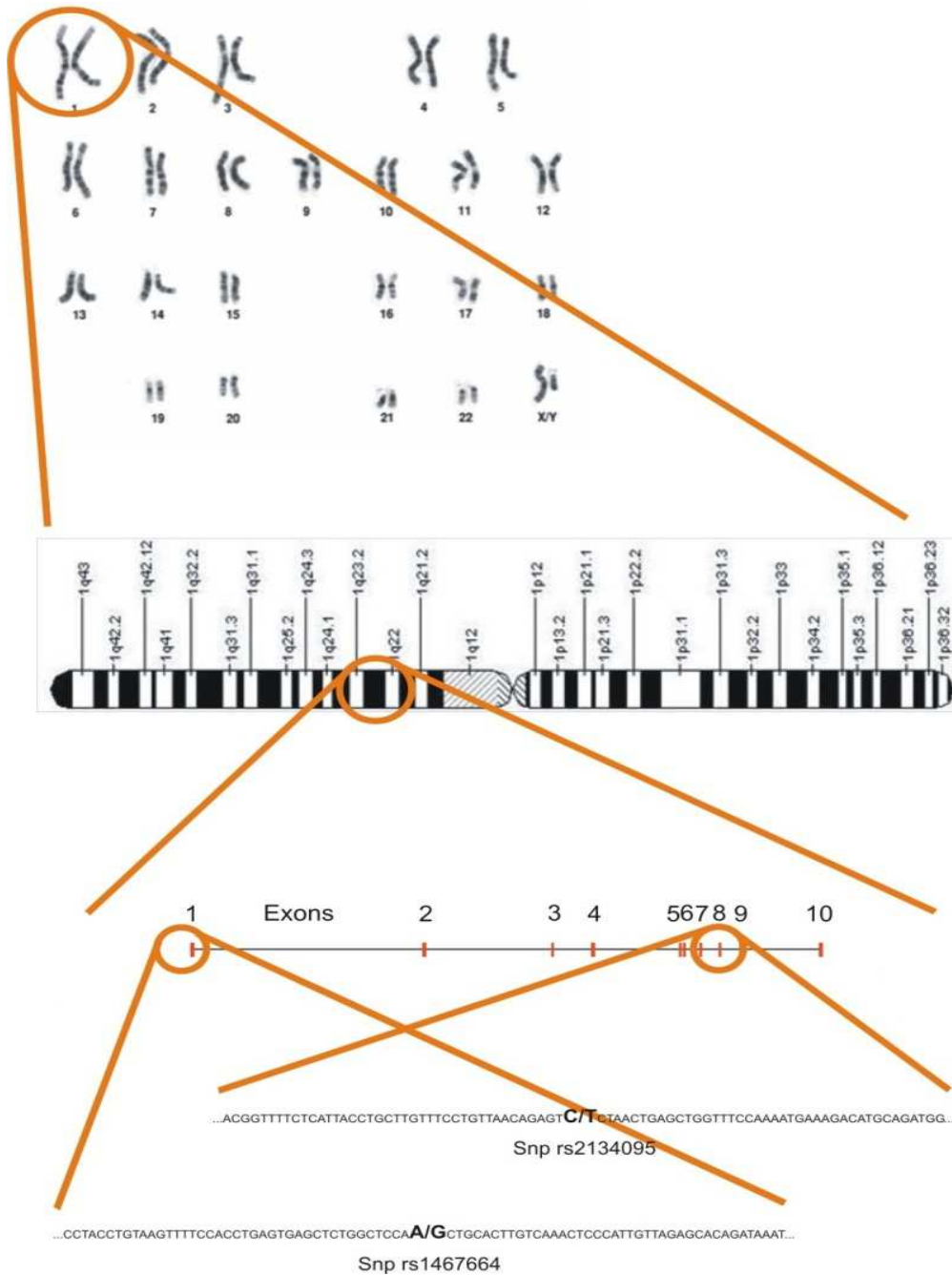


Abb. 06: Position der untersuchten Polymorphismen innerhalb der menschlichen DNA (nach U.S. National Library of Medicine)

C Fragestellung

In der Ätiologie der Schizophrenie zeigt sich eine starke genetische Komponente. Das genaue Zusammenspiel der Gene ist jedoch noch nicht erforscht. Durch die Beteiligung mehrerer Gene mit geringerer Einflußgröße ist ein Studiendesign erforderlich, das kleinste Effekte diverser Kandidatengene auf molekularer Ebene erkennen kann. Damit stellt die Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit ihrer hohen Sensitivität eine geeignete Methode dar, um die Entstehung so komplexer Erkrankungen wie der Schizophrenie zu untersuchen.

Retinoidrezeptoren präsentieren sich als interessantes Untersuchungsobjekt, da zahlreiche Gene, die ihrer Steuerung unterliegen, funktionelle Kandidatengene der Schizophrenie sind, wie zum Beispiel der Dopaminrezeptor D2. Der Retinoidrezeptor RXR gamma im speziellen liegt auf Chromosom 1 q22-23 nahe eines Bereiches mit deutlichen Kopplungserfolgen.

Anhand der Häufigkeit bestimmter Allele der Single-Nukleotid-Polymorphismen rs1467664 und rs2134095 wird auf eine Assoziation mit Schizophrenie geprüft. Als Fall-Kontrollstudie werden hierbei 287 Schizophreniepatienten 421 gesunden Probanden gegenübergestellt.

D Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Tab. 02: Geräte des Versuchsaufbaus

| Gerät | Fabrikat | Hersteller |
|----------------------|---|--------------------------------|
| Gelkammer | Wide Mini Sub Cell GT, Agarose Gel Elektrophoresis Systems | Bio Rad Laboratories, München |
| Mikrozentrifuge | Centrifuge 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| Photometer | Genequant | Pharmacia Biotech, Schweden |
| Photosystem | Eagle Eye II | Stratagene, USA |
| Pipetten | | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | | Sarstedt, Nümbrecht |
| Spannungsquelle | Power Pac 300 | Bio Rad Laboratories, München |
| Thermocycler | Mastercycler, Mastercycler gradient | Eppendorf, Hamburg |
| Ultratiefkühlschrank | ULT 1386 VOE | Revco Scientific, USA |
| Vortexer | Reax | Heidolph, Schwabach |
| Waage | Precisa 1620 C | Precisa Instruments, Schweiz |
| Wasserbad | WB 14 | Memmert, Schwabhausen |
| Zentrifuge | Centrifuge 5804 | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifugenröhrchen | PP Röhrchen, steril | Greiner Bio-One, Frickenhausen |

1.2 Chemikalien

Tab. 03: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|--|---|
| Agarose Neeo Ultraqualität | Carl Roth, Karlsruhe |
| DNA-Leiter | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| dNTP | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Bio Rad Laboratories, München |
| H ₂ O | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Loading Dye (6x): Bromphenolblau EDTA Glycerol (30%) | Carl Roth, Freiburg |
| NEB-Puffer 4 (10x) | Carl Roth, Freiburg |
| Primer | Life Technologies (Invitrogen), Karlsruhe |
| QIAamp DNA Blood Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Restriktionsenzyme: Hinf I Pvu II | Roche, Schweiz MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Streptokinase | Qiagen, Hilden |
| Taq-DNA-Polymerase | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| TBE-Puffer (5x): Borsäure EDTA-Dinatriumsalzdihydrat Trishydroxymethylaminomethan | Carl Roth, Karlsruhe |

1.3 Polymorphismen und Oligonukleotide

Tab. 04: Struktur, Position und Funktion der untersuchten SNPs:

| Gen | SNP ID | Position (bp) | Allel | Primersequenz (5'-3') | Funktion |
|--------------|-----------|---------------|-------|--|----------------|
| RXR gamma | rs1467664 | 163681557 | A/G | atctcgggtcagttccacac (f) taagttgaggtgggcctctc (r) | Promoterregion |
| RXR gamma | rs2134095 | 163644176 | T/C | tgagggtgcatcttttc (f) ccagttccgacttgatcatct (r) | Exon 8 |

2. Methoden

2.1 Teilnehmer der Assoziationsstudie

2.1.1 Kontrollgruppe

Die Studienteilnehmer setzen sich aus 421 gesunden, aus der Bevölkerung Münchens zufällig ausgewählten Freiwilligen zusammen. Sie waren beiderlei Geschlechts, deutschstämmig, nicht miteinander verwandt und zwischen 19 und 79 Jahre alt. Vor Studieneinschluß wurde ein Telefonscreening durchgeführt sowie eine schriftliche medizinische und psychiatrische Anamnese der Teilnehmer und ihrer Verwandten ersten Grades erstellt. Daraufhin wurden sie zu einem Interview eingeladen in Form eines *Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV* (SKID I und SKID II) (First et al. 1996, Witten et al. 1997). Zur psychiatrischen Beurteilung der Verwandten ersten Grades wurden das „Family History Assessment Module“ (Rice et al. 1995) herangezogen. Testpersonen mit relevanten somatischen Krankheiten, Achse I/II-Störungen (lifetime) oder positiver psychiatrischer Familienanamnese wurden ausgeschlossen.

2.1.2 Fallgruppe: Schizophrene Patienten

Untersucht wurde eine Gruppe von 287 Patienten des kaukasischen Typs beiderlei

Geschlechts, die unter Schizophrenie des paranoiden, desorganisierten oder undifferenzierten Typs nach DSM-IV-Kriterien litten. Das Alter lag zwischen 18 und 65 Jahren. Patienten, deren psychotische Symptome drogeninduziert oder auf somatische Erkrankungen zurückzuführen waren, wurden ausgeschlossen.

2.2 Molekulargenetische Untersuchung

2.2.1 Gewinnung von Genmaterial

Allen Probanden wurde venöses Blut abgenommen und in EDTA-haltigen Röhrchen bei -80°C gelagert.

Die Extraktion der genomischen DNA wurde mithilfe des QIAamp-Kits nach Standardprotokollen (QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook 2001) durchgeführt:

Auf jeweils 5-10ml Blut wurde 500µl Proteinase K zugegeben, die unerwünschte Proteine wie Hämoglobin, Nuklease und Histone verdaut und zur **Lyse** der Leukozyten und Freisetzung der Nukleinsäuren führt. Als nächstes wurde 12ml AL-Puffer (Guanidin-HCL) hinzugefügt, um ideale Bedingungen für die Proteinase zu schaffen, wie etwa den geeigneten pH-Wert. Die Lösung wurde nun 30 Minuten lang im Wasserbad bei 70°C zur Optimierung des Ertrags inkubiert.

Nach Ausfällung der DNA durch Zugabe von 10ml Ethanol (96-100%) erfolgte das Beladen der Silikagelsäule, welche dann bei 3000rpm zentrifugiert wurde, wodurch eine **Adsorption** der DNA, im Gegensatz zu Störfaktoren der PCR wie RNA und Proteine, an die Silikamembran stattfand. Zur **Reinigung** der DNA wurde guanidinhaltiger Waschpuffer AW 1 als Proteinentferner auf den Filter gegeben und bei 5000rpm zentrifugiert. Die Entfernung der Guanidiniumsalze geschah mithilfe von 5ml ethanolhaltigem Waschpuffers AW 2 und Zentrifugation bei 5000rpm, wodurch auch das Ethanol entfernt werden konnte.

Die Zugabe von 1ml AE-Puffer (Trispuffer, pH über 9) mit anschließender fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation für fünf Minuten mit 5000rpm bewirkte durch Anhebung des pH-Wertes die **Elution** der DNA von der Silikamembran, an die sie nur im sauren Milieu binden kann.

Vor dem Einsatz der so gewonnenen DNA in einer PCR wurde ihre Konzentration und

Material und Methoden

der Reinheitsgrad mithilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie photometrisch bestimmt, wobei der Gehalt der DNA sich in der Menge der von ihr absorbierten UV-Strahlung direkt proportional widerspiegelt. Dazu wurde die DNA zuerst 1:20 verdünnt, 5µl DNA-Lösung in AE-Puffer kamen auf 95µl Aqua bidest.

Das Absorptionsmaximum bei Nukleinsäuren besitzt eine Wellenlänge von 260nm (λ_1), das für Proteine eine Wellenlänge von 280nm (λ_2). Liegt der Quotient λ_1/λ_2 , wie bei reiner DNA vorausgesetzt, zwischen 1,7 und 1,9, bestimmt man die DNA-Konzentration nach der Formel: $\lambda_1 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50\mu\text{g/ml}$. Somit ergibt eine DNA-Lösung von 50µg/ml bei $\lambda_1=260$ nm eine Absorption von 1,0 (Sambrook 1989).

Die Messungen zeigten eine DNA-Konzentration von ca. 200µg/ml, woraufhin die DNA-Lösungen mit Wasser auf eine Konzentration von 25ng/µl vereinheitlicht und anschließend auf 96iger Mikrotiterplatten verteilt wurden.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Forscherteam um Kary B. Mullis entwickelte vor über zwanzig Jahren eine Methode, die es ermöglichte, geringste Mengen spezifischer DNA nachzuweisen, die sogenannte „polymerase chain reaction“ (Mullis 1990). Sie eröffnete die Möglichkeit zur millionenfachen Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen im Labor (Saiki et al. 1985):

Die „Primer“, zwei kurze designte Oligonukleotide, müssen sich komplementär an die Enden der ausgewählten Sequenz anlagern. Dadurch startet eine DNA-Polymerase an den jeweiligen 3'-OH-Enden den Aufbau der Ketten durch Einfügung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs).

2.2.2.1 Ablauf der PCR

Die gesamte Reaktion ist in drei Teilschritte unterteilt, welche bei unterschiedlichen Temperaturen vonstatten gehen, und wird in Zyklen wiederholt.

1. Schritt: Denaturierung

Die Denaturierung findet im Temperaturbereich um 94°C statt und stellt die Auftrennung der DNA in Einzelstränge dar (Volkenandt 1990).

2. Schritt: Annealing der Primer

Durch die Absenkung der Temperatur auf 50-70°C können die ausgewählten Primer spezifisch an den komplementären DNA-Strang hybridisieren.

3. Schritt: Elongation

Die Temperatur wird auf ca. 72°C erhöht, um das Arbeitsmaximum der Polymerase zu erreichen, welche nun eine Kopie der Matrizenstränge bewirkt.

Dieser Zyklus wird reaktionabhängig 25- bis 40-mal wiederholt, wobei das Endprodukt bei jedem neuen Zyklus das Ausgangsmaterial darstellt und die Menge des gewünschten DNA-Fragments sich so theoretisch verdoppeln kann, was nach 30 Zyklen bereits einer milliardenfachen Amplifikation entspricht. Ab einer Produktmenge von ca. 0,3mol kommt es zunehmend zu einer Abschwächung der Synthese aufgrund von Reannealing und Abnahme der Substratkonzentration als auch zu unspezifischen Reaktionsprodukten.

Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus

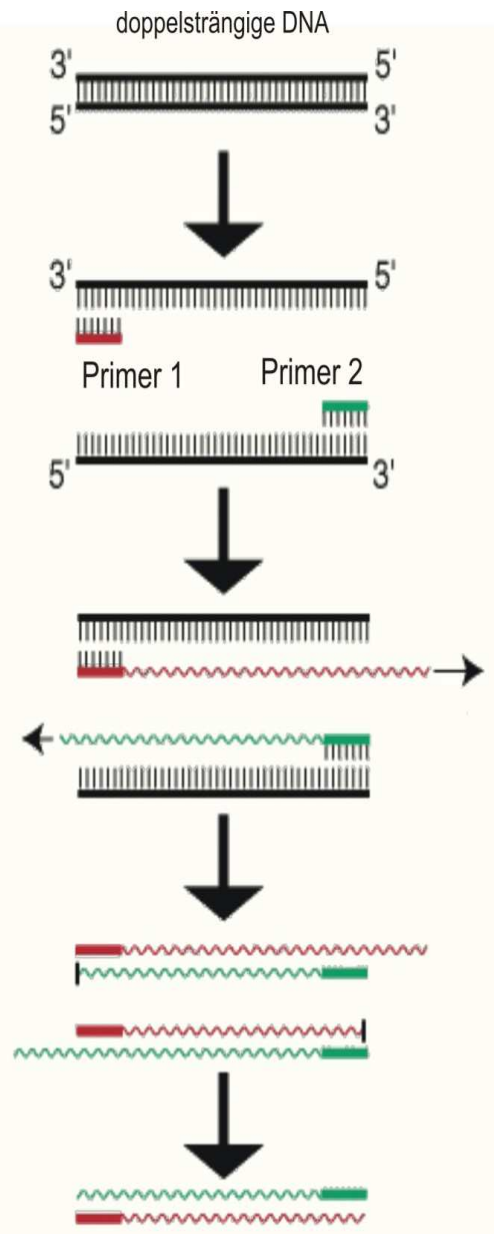


Abb. 07: Stilisierte Darstellung einer Polymerasekettenreaktion in Phasen (nach Meyer und Paulay 2005)

einem *E. coli*-Stamm, dem über ein Plasmid ein Gen der DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* übertragen wurde, einem hitzestabilen Bakterienstamm, der in einer Wassertemperatur von 75°C lebt. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt bei 72°C, doch ist sie auch bei 94°C noch intakt und kann so die Denaturierung überstehen (Saiki et al. 1988).

2.2.2.2 Bedingungen der PCR

Die Ermittlung der idealen Reaktionsbedingungen ist für eine hohe Spezifität der Amplifikate von großer Bedeutung:

- Das Enzym ermöglicht den automatisierten Ablauf der PCR. Die optimale **Enzymkonzentration** für einen 50µl-Ansatz sollte bei ca. 1 unit (U) Taq Polymerase liegen; eine höhere Enzymkonzentration kann die Nebenproduktbildung durch Abnahme der Substratspezifität verstärken.
- Die **Desoxynukleotide** dGTP, dATP, dCTP und dTTP müssen in jeweils gleicher Menge vorhanden sein. Ein gering konzentriertes Gemisch ist dabei von Vorteil, da sowohl die Fehlerhäufigkeit gering gehalten als auch ein inhibitorischer Effekt, wie er bei hohen Dosierungen durch Bindung freier Mg^{2+} -Ionen beobachtet wird, vermieden werden kann. Die Konzentration der **Magnesiumchlorid-Ionen** kann sich stark auf die Genauigkeit und den Ertrag der PCR auswirken, da die Ionen mit den Desoxynukleotiden einen Verbund eingehen, der für den Einbau dieser entscheidend ist. Sie steigern darüber hinaus die Polymeraseaktivität, erhöhen die spezifische Schmelztemperatur des DNA-Doppelstranges und beeinflussen die Bindung zwischen Primer und Matrize. Ein Mangel an Mg^{2+} -Ionen hätte einen geringeren Ertrag der Reaktion, ein Überschuß unspezifische Produkte zur Folge.
- Die **Primer** besitzen normalerweise eine Länge von 18-30 Basenpaaren. Der Anteil an GC-Nukleotiden muß so gewählt werden, daß die Schmelztemperatur der Primer ähnlich hoch ist. Zu vermeiden sind dabei Wiederholungen einzelner oder

Material und Methoden

mehrerer Nucleotide, was zur Leserasterverschiebung führen könnte, oder komplementäre 3'-OH-Enden, was eine Primer-Dimerbildung provoziert (Strachan, Read 1996).

Da keine aus anderen Studien bekannten Primerpaare Anwendung fanden, wurde zur Ermittlung der optimalen Primerkombination das Computerprogramm "Primer3" (Primer3, 2002) benutzt. Im Anschluß daran wurde die Spezifität der Primer und der Zielsequenzen mittels des Programms "BLAST" (Blast, 2002) überprüft.

Was die Konzentration der Primer im Mix betrifft, so muß eine ausreichende Anzahl für alle Zyklen zur Verfügung stehen, da ansonsten der Ertrag zu niedrig ausfällt, was bei einem 50µl-Ansatz etwa 10pmol je Primer entspricht. Zu hohe Konzentrationen führen zur Bildung von Primerdimeren und vermindern so die Spezifität der Reaktion.

- Was die Auswahl geeigneter **Puffer** angeht, liegt das pH-Optimum bei pH 8,8. Bei einem Wert unter pH 8 kann das Enzym bereits eine verminderte Aktivität aufweisen.
- Die verschiedenen **Temperaturphasen** sollten wie folgt variiert werden:

1. Denaturierung

Bei vermehrtem GC-Gehalt der Sequenz sollte die Temperatur gegenüber Standardbedingungen höher eingestellt werden.

2. Annealing

Obwohl die Temperatur individuell je Primersequenz empirisch ermittelt werden muß, gibt es die Möglichkeit, die spezifische Schmelztemperatur der Primer zu berechnen, unter der die Annealingtemperatur liegen muß:

$$\text{Anzahl GC-Basen} \times 4 + \text{Anzahl AT-Basen} \times 2$$

Je länger der Primer ist, desto höher muß folglich die Temperatur liegen. Eine zu hohe Temperatur verhindert die Anlagerung der Primer und die Produktausbeute fällt entsprechend gering aus. Eine zu niedrige Temperatur hingegen hat unspezifische Nebenprodukte als Konsequenz.

Die günstigste Annealing-Temperatur wurde im Thermocycler "Mastercycler Gradient"

ermittelt. Über einen Temperaturgradienten konnte der Ertrag an DNA bei unterschiedlichen Temperaturen unter ansonsten gleichen Bedingungen verglichen werden.

3. Elongation

Da die *Taq*-Polymerase 1kb/min zu synthetisieren vermag, erfordert eine größere DNA-Sequenz eine länger andauernde Elongationsphase.

- Was die **Zyklenzahl** betrifft, sollte die PCR dann beendet werden, wenn oben genannte Plateauphase erreicht wird – also die Syntheserate stark abnimmt –, um unspezifische Nebenprodukte zu vermeiden. Würden zu wenige Zyklen eingestellt, wäre die Ausbeute zu gering.
- Beim **PCR-Mix** werden die Reagenzien in folgender Reihenfolge pipettiert:
 1. DNA
 2. PCR-Wasser
 3. Puffer
 4. Primer
 5. dNTP
 6. Taq-Polymerase

Eine frühzeitige Hinzugabe von dNTP und Taq-Polymerase erhöht die Gefahr unspezifischer Produkte.

Zum Ausschluß etwaiger Kontaminationen innerhalb der Reagenzien wird eine Negativprobe ohne DNA angesetzt.

2.2.3 Gelelektrophorese

2.2.3.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine probate Methode dar, um den Erfolg einer PCR abzulesen, also ob und in welcher Länge ein PCR-Produkt entstanden ist. Sie beruht auf dem Prinzip der Migration geladener Teilchen im elektrischen Feld. DNA-Moleküle erweisen sich dafür als besonders geeignet, da Nukleinsäuremoleküle sich durch ihre

Material und Methoden

negative Ladung grundsätzlich in Richtung Anode bewegen.

Die Migrationsgeschwindigkeit hängt hierbei von der Größe der Fragmente ab: durch den Siebeffekt der Agarose kann ein Fragment umso schneller durch das Gel wandern, je kleiner es ist (Rehm, Hammar 2007). So lassen sich DNA-Moleküle über einen Bereich von etwa 100bp bis zu 50kb auftrennen.

Agarose ist ein aus roten Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid, das in den Elektrophoresepuffer aufgenommen und durch Erhitzen gelöst wird. Dank der zahlreichen Hydroxy-Gruppen und der daraus resultierenden Wasserstoffbrückenbindungen entsteht bei der Abkühlung die für die Migration relevante großporige Gelmatrix.

2.2.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

2%ige Agarose-Lösung mit 0,5xTBE-Puffer wurde in der Mikrowelle zum Siedepunkt erhitzt, bis eine klare und niedrigvisköse Lösung entstand. Nach Abkühlung und Zugabe von 2µl/100ml Ethidiumbromid-Lösung wurde das Gel in die Gelkammern eingefüllt. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, in die DNA-Helix zu interkalieren und bei Beleuchtung mit UV-Licht zu fluoreszieren.

Nach Entstehung des durch Erkalten auspolymerisierten Gels wird die Gelkammer mit 0,5xTBE-Puffer geflutet. Jeweils 5µl der DNA-Proben werden mit 1µl Ladepuffer versetzt und in die durch Kämme entstandenen Geldaschen pipettiert. Hauptbestandteil des Ladepuffers ist Glycerin, durch dessen hohe Dichte die DNA in die Taschen absinkt. Eine zusätzlich auf das Gel aufgetragene DNA-Leiter mit Plasmidfragmenten definierter Größe dient als Maßstab für die Länge der Produkte. Nach Anlegen einer Gleichspannung von 100mV erfolgen nun die Wanderung und die damit verbundene Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe innerhalb eines Zeitraums von 30min bis einer Stunde. Durch die Fluoreszenzeigenschaften des Ethidiumbromids kann anschließend das Gel unter UV-Licht ausgewertet werden. Dazu wurde die Ablichtung des Gels mit dem "Eagle Eye"-Gerät der Firma Stratagene durchgeführt.

Folgende Reagenzien wurden bei der Gelelektrophorese verwendet:

Material und Methoden

| | |
|-----------------|---|
| Agarose: | als gebrauchsfertiges Pulver |
| Ethidiumbromid: | als gebrauchsfertige Lösung |
| 0.5xTBE-Puffer: | 0,54% Trisbase |
| | 0,275% Borsäure |
| | 0,0375% Na ² -EDTA |
| 6xLoading Dye | 1,5ml Bromphenolblau |
| | 3,0ml Glycerollösung (30%) |
| | 100,0ml EDTA-Lösung (0,5M) |
| | 5,4ml H ₂ O |
| DNA-Leiter | 100µl Gene-Ruler Stammlösung (0,5mg DNA/ml) |
| | 166µl 6xLoading Dye |
| | 734µl H ₂ O |

2.2.4 Auswertung der untersuchten Polymorphismen

Die millionenfach amplifizierte DNA-Sequenz wird nun mit einem spezifischen Restriktionsenzym behandelt. Liegt eine Schnittstelle vor, entstehen zwei kürzere Fragmente, ist dies nicht der Fall, bleibt das Fragment in seiner ursprünglichen Länge bestehen. Durch das Vorhandensein zweier Allele entstehen die Kombinationsmöglichkeiten homozygot geschnitten, heterozygot geschnitten und – ohne Schnittstelle bei beiden Allelen – homozygot ungeschnitten.

Die Auswertung der Elektrophorese zeigt bei der ungeschnittenen Variante eine einzige deutliche Bande. Sind beide Allele geschnitten, finden sich zwei Banden auf Höhe der Fragmente mit niedrigerer Anzahl an Basenpaaren. Bei heterozygoten Probanden sind alle drei Banden erkennbar.

2.2.4.1 SNP rs1467664

Die Region um den Polymorphismus rs1467664 wurde durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert (Abb 08).

Material und Methoden

| | | |
|-----------|---|--------------------------------|
| 163681382 | ATCTCGGGTCAGTTCCACAC | AAGACAGGCTCTGTGTTAGTGAGGACCCAG |
| 163681432 | TGGTGTTTTTGAACAGGCGGCAGGATAACAATGGTATATAAAATAAATGC | |
| 163681482 | AGAGAAAGACCTCCACATCAAGCCAACCCCTCCTCCCTACCTGTAAGTTTT | |
| 163681533 | CCACCTGAGTGAGCTCTGGCTCCA | A/G CTGCACTTGTCAAACTCCCATTGT |
| 163681582 | TAGAGCACAGATAAATGCTTCCGGCCACCCAAGCAG | GAGAGGCCACCTC |
| 163681632 | AACTTA | |

Abb. 08: Darstellung der Basenfolge des 256 bp großen amplifizierten DNA-Teilstücks mit Forward-Primer (gelb), Reverse-Primer (rot) und SNP rs1467664 (grau)

Bei einem Gesamtvolumen von 25µl wurden DNA, PCR-Wasser, Puffer, Magnesiumchlorid, Taq-Polymerase, Sense- und Antisenseprimer und Desoxynukleotidtriphosphate verwendet (Tabelle 5). Das PRC-Programm startete mit einer initialen Denaturierung von fünf Minuten bei 94°C, worauf 37 Zyklen folgten, die jeweils aus 30s bei 94°C, 1min bei 60°C und 1min bei 72°C bestanden. Abgeschlossen wurde der Vorgang mit einer Extension bei 72°C für 10min.

Material und Methoden

Tab. 05: Darstellung der PCR

| | |
|------------------|--|
| Ausgangslösungen | DNA-Lösung (50ng/μl) PCR geeignetes Wasser (Sigma) 10xPuffer (750mM Tris-HCl, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas) Magnesiumchlorid (25mM) (Fermentas) Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) Sense Primer-Arbeitslösung (10pM) (Invitrogen) Sequenz: 5' attctcgggtcagttccacac 3' Antisense Primer-Arbeitslösung (10pM) (Invitrogen) Sequenz: 5' taagttgaggtgggcctctc 3' Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 2,5mM) (Amersham Biosciences) |
| 25μl Ansatz | 1,0μl Template-DNA (50ng/μl) 16,0μl PCR-Wasser (ad 25μl) 2,5μl 10xPuffer 2,0μl MgCl ₂ 0,5μl Desoxynukleotidtriphosphate 1,0μl Antisense Primer (10pmol/μl) 1,0μl Sense Primer (10pmol/μl) 1,0μl Taq (1U/μl) |
| Programm | 1. Denaturierung: 5min bei 94°C 2. 37 Zyklen á Denaturierung: 30s bei 94°C Annealing: 60s bei 60°C Extension: 60s bei 72°C 3. Extension: 10min bei 72°C |

Der anschließende Restriktionsverdau wurde mit dem Enzym Pvu II durchgeführt, welches eine achtsündige Inkubation bei 37°C benötigte. Als spezifische Schnittstelle erkannte es die Basenfolge 5' CAG//CTG 3' und spaltete das 256 Basenpaare enthaltende DNA-Fragment in zwei kleinere Teilstücke, 176 und 80 Basenpaare groß,

Material und Methoden

falls sich an Stelle 176 die Base Guanin fand. War an dieser Stelle die Base Adenin vorhanden, schnitt das Enzym nicht und das Fragment blieb in voller Länge erhalten; das Allel wurde als „Allel 1“ bzw. „Adenin(A)-Allel“ deklariert. Im Falle der Spaltung bei Guanin fand die Nomenklatur „Allel 2“ oder „Guanin(G)-Allel“ Anwendung, wodurch sich folgende Kombinationen als Genotypen ergeben können:

- Homozygotie für Allel A (homozygot ungeschnitten, A/A)
- Heterozygotie für Allele A und G (heterozygot geschnitten, A/G)
- Homozygotie für Allel G (homozygot geschnitten, G/G)

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein 2%iges Agarosegel (Tab.06). Die Banden wurden anschließend durch UV-Anregung im Eagle Eye sichtbar gemacht und ausgewertet (Abb. 09).

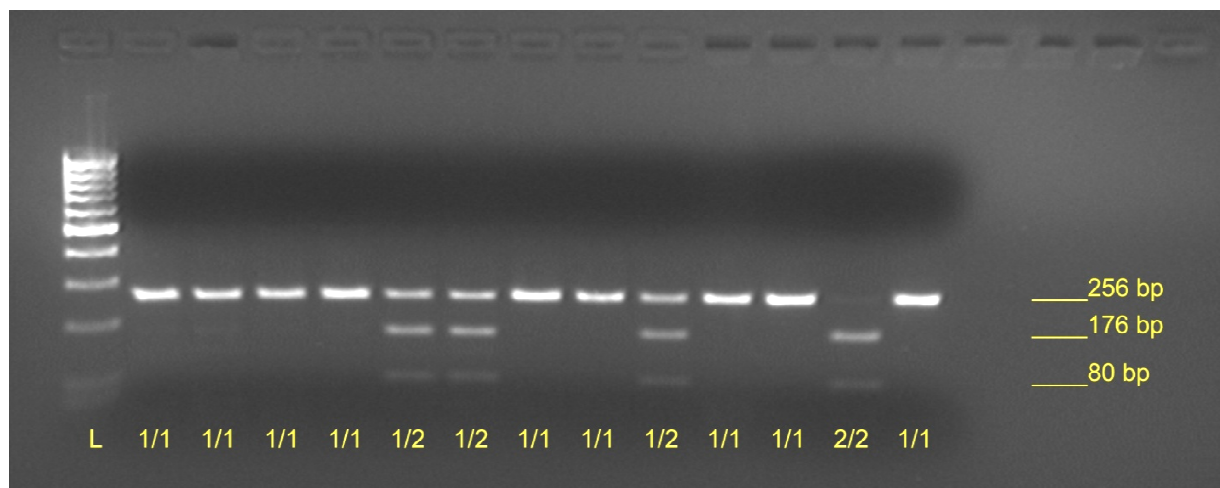


Abb. 09: Rs1467664-Polymorphismus des RXR gamma-Gens nach Pvu II-Verdau auf Agarosegel: 1=A, 2=G, homozygot ungeschnitten (A/A) bei 256 bp, homozygot ungeschnitten (G/G) bei 176 und 80 bp, heterozygot geschnitten (A/G) bei 256, 176 und 80 bp; am linken Bildrand der Längenmaßstab (L)

Material und Methoden

Tab. 06: Darstellung des Restriktionsverdaus

| | |
|-------------------|---|
| Ausgangslösungen | PCR-Produkt PVU II-Restriktionsenzym (10 000 U/ml) (Fa. Fermentas) 10xPuffer G+ (Fermentas) PCR-Wasser |
| 50µl Ansatz | 20,0µl PCR-Produkt 24,5µl PCR-Wasser (ad 50µl) 5,0µl 10xPuffer G+ 0,5µl PVU II (5U) |
| Bedingungen | 8h bei 37°C |
| Gelelektrophorese | 2% Agarosegel (2g pro 100ml 0,5xTBE-Puffer) Laufzeit: ca. 40min bei 90mV |

2.2.4.2 SNP rs2134095

Ein 214 Basenpaare umfassendes DNA-Teilstücks um den SNP rs2134095 wurde mittels PCR vervielfältigt (Abb. 10).

| | | |
|-----------|---|-------------------------------|
| 163644020 | TGAGGGGTTGCATCTTTTCA | TTTCTGTACCCCTAGTAACTGGTACATCA |
| 163644070 | TCTGGAAACAGAGTGGGCTTATAAAAATTTTGGTTGAATTCATTTTATTG | |
| 163644120 | GCTCTTGGCCTGTTACTTACGGTTTTCTCATTACCTGCTTGTTTCCTGTTA | |
| 163644169 | ACAGAGT T/C CTAAGTGAAGCTGGTTTCCAAAATGAAAGACATGCA | GAT |
| 163644216 | GGACAAGTCGGAAGTGG | |

Abb. 10: Darstellung der Basenfolge der 214bp großen amplifizierten DNA-Sequenz mit Forward-Primer (gelb), Reverse-Primer (rot) und SNP rs2134095 (grau)

In dem Reaktions-Ansatz von 25µl waren außer den spezifischen Primern die gleichen Ausgangslösungen in etwas anderem Verhältnis enthalten. Auch wurde das PCR-

Material und Methoden

Programm modifiziert, sodaß die Annealing-Temperatur bei 55°C lag (Tab. 07):

Tab.07: Darstellung der PCR

| | |
|------------------|---|
| Ausgangslösungen | DNA-Lösung (50ng/µl) PCR geeignetes Wasser (Sigma) 10xPuffer (750mM Tris-HCl, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas) Magnesiumchlorid (25mM) (Fermentas) Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) Sense Primer-Arbeitslösung (10pM) (Invitrogen) Sequenz: 5' TGAGGGGTTGCATCTTTTTC 3' Antisense Primer-Arbeitslösung (10pM) (Invitrogen) Sequenz: 5' CCAGTTCCGACTTGTCCATC 3' Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 2,5mM) (Amersham Biosciences) |
| 25µl Ansatz | 1,0µl Template-DNA (50ng/µl) 17,0µl PCR-Wasser (ad 25µl) 2,5µl 10xPuffer 2,0µl MgCl ₂ 0.5µl Desoxynukleotidtriphosphate 0,5µl Antisense Primer (10pmol/µl) 0,5µl Sense Primer (10pmol/µl) 1,0µl Taq (1U/µl) |
| Programm | 1. Denaturierung: 5min bei 94°C 2. 37 Zyklen á Denaturierung: 30s bei 94°C Annealing: 60s bei 55°C Extension: 60s bei 72°C 3. Extension: 10min bei 72°C |

Der Verdau fand mithilfe des Restriktionsenzym Hinf I bei einer achtestündigen Inkubation bei 37°C statt. Es wurde die Basenfolge 5' G//AGTC 3' als Schnittstelle

Material und Methoden

erkannt, wobei das 214 Basenpaare große DNA-Fragment in zwei Teilstücke geschnitten wurde, eines mit 155 Basenpaaren, und ein kleineres, 59 Basenpaare enthaltend (Allel C). Fand sich an Stelle 162 nicht die Base Cytosin, sondern Thymin, blieb das DNA-Fragment in voller Länge seiner 214 Basenpaare erhalten (Allel T), wodurch folgende Kombinationen möglich waren:

- Homozygotie für Allel T (homozygot ungeschnitten, T/T)
- Heterozygotie für Allele T und C (heterozygot geschnitten, T/C)
- Homozygotie für Allel C (homozygot geschnitten, C/C)

Die Elektrophorese machte die unterschiedlich langen Fragmente auf einem 2%-Agarosegel dank der Fluoreszenz von Ethidiumbromid unter UV-Licht als Banden sichtbar, um sie den entsprechenden Allelen zuzuordnen.

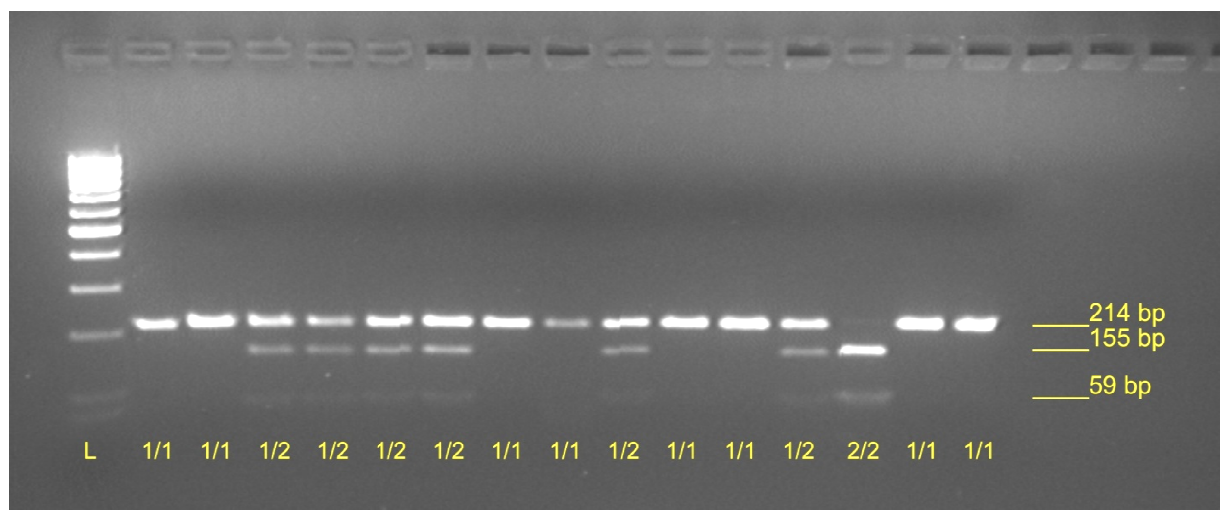


Abb. 11: Rs2134095-Polymorphismus des RXR gamma-Gens nach Hinf I-Verdau auf Agarosegel: 1=T, 2=C, homozygot ungeschnitten (T/T) bei 214bp, homozygot ungeschnitten (C/C) bei 155 und 59bp, heterozygot geschnitten (T/C) bei 214, 155 und 59bp; am linken Bildrand der Längenmaßstab (L)

Material und Methoden

Tab. 08: Darstellung des Restriktionsverdaus

| | |
|-------------------|---|
| Ausgangslösungen | PCR-Produkt Hinf I-Restriktionsenzym (10 000U/ml) (Roche) 10xPuffer H (Roche) PCR-Wasser |
| 50µl Ansatz | 10,0µl PCR-Produkt 16,5µl PCR-Wasser (ad 20µl) 3,0µl 10xPuffer H 0,5µl Hinf I (5U) |
| Bedingungen | 8h bei 37° |
| Gelelektrophorese | 2% Agarosegel (2g pro 100ml 0,5xTBE-Puffer) Laufzeit: 35min bei 90mV |

2.2.5 Statistische Auswertung

Als Statistikprogramm wurde SPSS 16.0 verwendet (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, 2007).

Die Genotypverteilung wurde hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet, worin von einer modellhaften Population mit konstantem Genpool ausgegangen wird.

Die Formel für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lautet:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Die Häufigkeit der Allele und Genotypen wurde mithilfe des Chi-Quadrattests nach Pearson verglichen, woraus sich der χ^2 -Wert und der p-Wert der symptotischen Signifikanz berechnen lässt. Hierbei wurde von einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ausgegangen, wobei ein p-Wert von unter 0,1 einen Trend markiert. Des weiteren wurde die Odds Ratio samt 95%-Konfidenzintervall ermittelt.

E Ergebnisse

1. Ergebnisse des SNP rs1467664

1.1 Allelverteilung

Als erstes wurde die Verteilung der Allele für Adenin und Guanin ungeachtet des Genotyps betrachtet (Tab. 9).

Tab. 09: Allelverteilung von Adenin zu Guanin des SNP rs1467664

| | | SNP rs1467664 | | Gesamt |
|---------------|--------|-----------------|-----------------|--------|
| | | Allel 1: Adenin | Allel 2: Guanin | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 722 | 120 | 842 |
| | % | 85,7% | 14,3% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 473 | 91 | 564 |
| | % | 83,9% | 16,1% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 1195 | 211 | 1406 |
| | % | 85,0% | 15,0% | 100% |

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele zwischen Patienten- und Kontrollgruppe:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,939$ df=1 p=0,333

Odds Ratio: 1,158 (0,861-1,556)

1.2 Genotypverteilung

Im Folgenden wird die Aufteilung der Genotypen nach den Allelkombinationen Adenin/Adenin (A/A), Adenin/Guanin (A/G) und Guanin/Guanin(G/G) dargestellt (Tab. 10).

Ergebnisse

Tab. 10: Verteilung der Genotypen A/A, A/G und G/G des SNP rs1467664

| | | SNP rs1467664 | | | Gesamt |
|---------------|--------|----------------|----------------|----------------|--------|
| | | Genotyp A/A | Genotyp A/G | Genotyp G/G | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 308 | 106 | 7 | 421 |
| | % | 73,16% | 25,18% | 1,66% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 202 | 69 | 11 | 282 |
| | % | 71,6% | 24,5% | 3,9% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 510 | 175 | 18 | 703 |
| | % | 72,5% | 24,9% | 2,6% | 100% |

Hierbei stellte sich vorerst die Frage, ob die Genotypfrequenzen der Kontroll- und der Patientengruppe sich im *Hardy-Weinberg-Gleichgewicht* befinden (Tab. 11,12).

Tab. 11: Frequenz der Genotypen A/A, A/G und G/G der Kontrollgruppe des SNP rs1467664 im Spiegel des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

| Genotyp | | SNP rs1467664: Kontrollgruppe | |
|---------|--------|-------------------------------|-------------|
| | | Erwartung | Beobachtung |
| A/A | Anzahl | 309,9 | 308 |
| | % | 73,6% | 73,2% |
| A/G | Anzahl | 103,1 | 106 |
| | % | 24,5% | 25,2% |
| G/G | Anzahl | 8,4 | 7 |
| | % | 2,0% | 1.7% |

F=-0,975 df=1 p=0,54

Ergebnisse

Tab. 12: Frequenz der Genotypen A/A, A/G und G/G der Patientengruppe des SNP rs1467664 im Spiegel des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts:

| Genotyp | | SNP rs1467664: Patientengruppe | |
|---------|--------|--------------------------------|-------------|
| | | Erwartung | Beobachtung |
| A/A | Anzahl | 198,2 | 202 |
| | % | 70,3% | 71,6% |
| A/G | Anzahl | 76,4 | 69 |
| | % | 27,1% | 24,5% |
| G/G | Anzahl | 7,3 | 11 |
| | % | 2,6% | 3,9% |

$F=0,096$ $df=1$ $p=0,11$

Die Verteilung der Genotypen bei Kontroll- und Patientengruppe befanden sich innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.

Aus dem Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ergab sich keine signifikante Assoziation mit Schizophrenie:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=3,392$ $df=2$ $p=0,183$

In der nächsten Untersuchung wurden die Genotypen A/G und G/G als eine Gruppe dem Genotyp A/A gegenübergestellt (Tab. 13).

Ergebnisse

Tab. 13: Verteilung der Genotypen A/G und G/G gegenüber A/A des SNP rs1467664

| | | SNP rs1467664 | | Gesamt |
|---------------|--------|----------------|--------------------------|--------|
| | | Genotyp A/A | Genotypen A/G und G/G | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 308 | 113 | 421 |
| | % | 73,2% | 26,8% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 202 | 80 | 282 |
| | % | 71,6% | 28,4% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 510 | 193 | 703 |
| | % | 72,5% | 27,5% | 100% |

Auch hierbei konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,198$ df=1 p=0,656

Odds Ratio: 1,079 (0,771-1,512)

Als letztes wurden die Genotypen A/A und A/G zusammengefaßt und mit G/G verglichen (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilung der Genotypen A/A und A/G gegenüber G/G des SNP rs1467664

| | | SNP rs1467664 | | Gesamt |
|---------------|--------|--------------------------|----------------|--------|
| | | Genotypen A/A und A/G | Genotyp G/G | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 414 | 7 | 421 |
| | % | 98,3% | 1,7% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 271 | 11 | 282 |
| | % | 96,1% | 3,9% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 685 | 18 | 703 |
| | % | 97,4% | 2,6% | 100% |

Ergebnisse

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=3,390$ $df=1$ $p=0,066$

Odds ratio: 2,401 (0,919-6,269)

Hierbei war ein Trend erkennbar hinsichtlich des vermehrten Auftretens der Homozygotie des Guanin-Allels innerhalb der Patientengruppe.

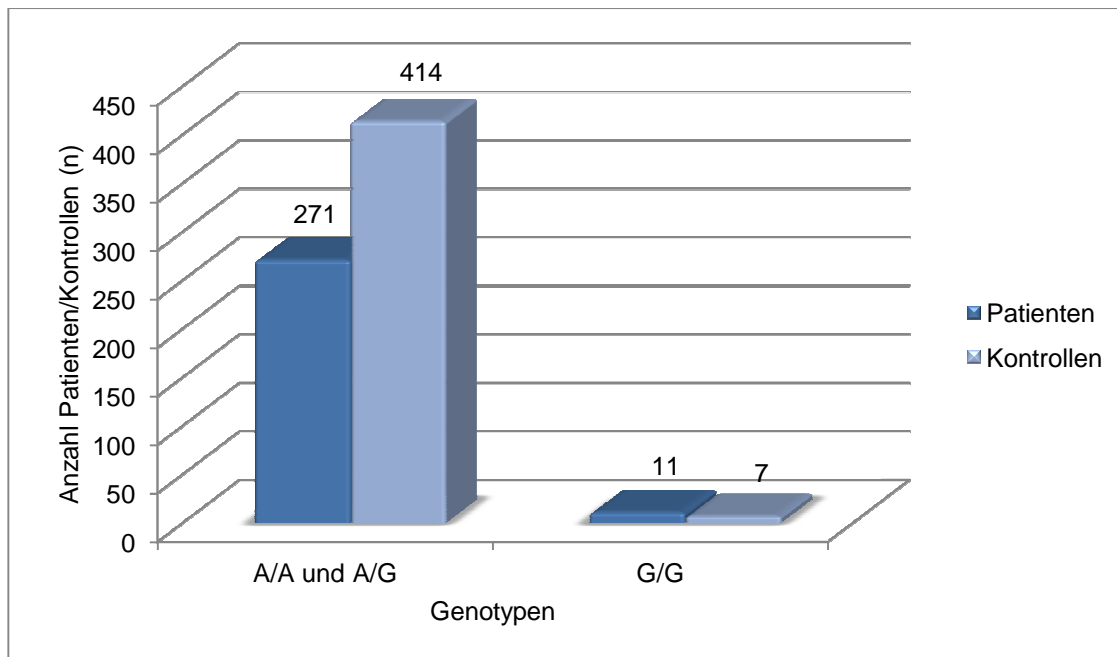


Abb. 12: Graphische Darstellung der Verteilung der Genotypen A/A und A/G gegenüber Genotyp G/G innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe

2. Ergebnisse des SNP rs2134095

2.1 Allelverteilung

Die Allele Thymin und Cytosin teilten sich auf Kontroll- und Patientengruppe unbeachtet der Genotypkonstellationen wie folgt auf (Tab. 15).

Ergebnisse

Tab. 15: Allelverteilung von Thymin zu Cytosin des SNP rs2134095.

| | | SNP rs2134095 | | Gesamt |
|---------------|--------|-----------------|------------------|--------|
| | | Allel 1: Thymin | Allel 2: Cytosin | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 555 | 279 | 834 |
| | % | 66,5% | 33,5% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 385 | 189 | 574 |
| | % | 67,1% | 32,9% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 940 | 468 | 1406 |
| | % | 66,8% | 33,2% | 100% |

Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ersichtlich:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,042$ df=1 p=0,837

Odds ratio: 0,977 (0,779-1,224)

2.2 Genotypverteilung

Die Aufteilung der Genotypen nach den Allelkombinationen Thymin/Thymin (T/T), Thymin/Cytosin (T/C) und Cytosin/Cytosin(C/C) ergab folgendes Bild (Tab 16).

Ergebnisse

Tab. 16: Verteilung der Genotypen T/T, T/C und C/C des SNP rs2134095.

| | | SNP rs2134095 | | | Gesamt |
|---------------|--------|----------------|----------------|----------------|--------|
| | | Genotyp T/T | Genotyp T/C | Genotyp C/C | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 181 | 193 | 43 | 417 |
| | % | 43,4% | 46,3% | 10,3% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 129 | 127 | 31 | 287 |
| | % | 44,9% | 44,3% | 10,8% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 310 | 320 | 74 | 704 |
| | % | 44,0% | 45,5% | 10,5% | 100% |

Ob die Genotypfrequenzen der Kontroll- und der Patientengruppe sich hierbei innerhalb des *Hardy-Weinberg-Gleichgewichts* befanden, klärten folgende Betrachtungen (Tab. 17, 18).

Tab. 17: Frequenz der Genotypen T/T, T/C und C/C der Kontrollgruppe des SNP rs2134095 im Spiegel des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.

| Genotyp | | SNP rs2134095: Kontrollgruppe | |
|---------|--------|-------------------------------|-------------|
| | | Erwartung | Beobachtung |
| T/T | Anzahl | 184,7 | 181 |
| | % | 44,3% | 43,4% |
| T/C | Anzahl | 185,6 | 193 |
| | % | 44,5% | 46,3% |
| C/C | Anzahl | 46,7 | 43 |
| | % | 11,2% | 10,3% |

F=-0,039 df=1 p=0,54

Ergebnisse

Tab. 18: Frequenz der Genotypen T/T, T/C und C/C der Patientengruppe des SNP rs2134095 im Spiegel des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.

| Genotyp | | SNP rs2134095: Patientengruppe | |
|---------|--------|--------------------------------|-------------|
| | | Erwartung | Beobachtung |
| T/T | Anzahl | 129,2 | 129 |
| | % | 45,0% | 44,9% |
| T/C | Anzahl | 126,8 | 127 |
| | % | 44,2% | 44,3% |
| C/C | Anzahl | 31,0 | 31 |
| | % | 10,8% | 10,8% |

$F=-0,002$ $df=1$ $p=0,96$

Sowohl Kontroll-, als auch Patientengruppe befanden sich hinsichtlich der Genotypverteilung innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.

Aus der Gegenüberstellung von Kontroll- und Patientengruppe ergab sich kein signifikanter Hinweis auf Assoziation mit Schizophrenie:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,285$ $df=2$ $p=0,867$

In der folgenden Tabelle werden die Genotypen T/C und C/C innerhalb einer Gruppe mit dem Genotyp T/T verglichen (Tab 19).

Ergebnisse

Tab. 19: Verteilung der Genotypen T/C und C/C gegenüber T/T des SNP rs2134095:

| | | SNP rs2134095 | | Gesamt |
|---------------|--------|----------------|--------------------------|--------|
| | | Genotyp T/T | Genotypen T/C und C/C | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 181 | 236 | 417 |
| | % | 43,4% | 56,6% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 129 | 158 | 287 |
| | % | 44,9% | 55,1% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 310 | 394 | 704 |
| | % | 44,0% | 56,0% | 100% |

Hierbei unterschieden sich Kontrollen und Patienten nicht maßgeblich:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,164$ df=1 p=0,685

Odds ratio: 0.939 (0,694-1,271)

Die Genotypen T/T und T/C wurden zusammen dem homozygoten Cytosin-Genotyp gegenübergestellt (Tab 20).

Tab. 20: Verteilung der Genotypen T/T und T/C gegenüber C/C des SNP rs2134095

| | | SNP rs2134095 | | Gesamt |
|---------------|--------|--------------------------|----------------|--------|
| | | Genotypen T/T und T/C | Genotyp C/C | |
| 1. Kontrollen | Anzahl | 374 | 43 | 417 |
| | % | 89,7% | 10,3% | 100% |
| 2. Patienten | Anzahl | 256 | 31 | 287 |
| | % | 89,2% | 10,8% | 100% |
| gesamt | Anzahl | 630 | 74 | 704 |
| | % | 89,5% | 10,5% | 100% |

Ergebnisse

Der prozentuale Anteil an den Genotypen zeigte sich beim Patienten- und Kontrollkollektiv als fast identisch, was gegen eine Assoziation mit Schizophrenie spricht:

Chi-Quadrat-Test nach Pearson: $\chi^2=0,043$ df=1 p=0,835

Odds ratio: 1,053 (0,646-1,716)

F Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden SNPs rs1467664 (-803A>G der 5'UTR) und rs2134095 (36579T>C des Exon 8) nicht signifikant mit Schizophrenie assoziiert werden. Bei ersterem SNP war hinsichtlich der homozygoten Konstellation des selteneren Allels (G/G) ein Trend erkennbar ($p=0,066$), welche bei Patienten mehr als doppelt so oft auftrat wie in der Kontrollgruppe.

1. Diskussion der Methodik und Ergebnis der eigenen Studie

Die Assoziationsstudie ist ein geeignetes Studiendesign zur Untersuchung komplexer, polygenetisch bedingter Erkrankungen, da sie die Sensitivität zur Untersuchung von Suszeptibilitätsgenen geringen Beitrags besitzt (Bailer et al. 2002).

Die Lokalisation der beiden ausgewählten SNPs innerhalb des RXR gamma-Gens ist durch ihre Distanz günstig. Da ein SNP vor dem 5' Ende des Gens, der andere auf dem achten von zehn Exons liegt, stehen sie nicht so leicht in Gefahr, im Kopplungsgleichgewicht zu liegen und können dazu als Marker ein größeres Gebiet des Gens detektieren.

Ein weiterer Vorteil liegt in der unterschiedlichen funktionellen Bedeutung der beiden Loci. So ist der SNP rs1467664 am 5' Ende des Gens dem codierenden Bereich vorgelagert und kann sich in der Nähe einer Promoterregion befinden. Diese reguliert in Zusammenspiel mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren die Aktivität eines Gens. Als bekanntes Beispiel einer solchen Promotorerkennungssequenz gilt die TATA-Box, welche sich in der Regel 25-30 Basenpaare vor der Startstelle der Transkription befindet (Tokusumi et al. 2007). Genomweit sind insgesamt 775 unterschiedliche Promoter bekannt (Pennisi 2007). Der zweite SNP rs2134095 hingegen befindet sich durch seine Lage auf Exon 8 im RNA-codierenden Bereich. Auch wenn sein Basenaustausch nicht zu einer Aminosäureänderung führt, da immer Valin synthetisiert wird, so kann er als Marker durchaus im Kopplungsgleichgewicht mit einem etwaigen essentiellen Polymorphismus stehen, der eine Aminosäurenvariation provoziert.

Diskussion

Grundsätzlich problematisch zeigt sich in Studien ein zu geringes Auftreten des selteneren Allels innerhalb eines Polymorphismus. Während bei SNP rs2134095 die durchschnittliche Verteilung ca. 2/1 ist, was eine hohe Aussagekraft zulässt, tritt bei SNP 1467664 das seltenere Allel noch etwa zu 15% auf. Allerdings zeigt sich beim Vergleich des Genotyps G/G, also des homozygoten Auftretens des seltenen Allels, gegen die zusammengefaßten restlichen Genotypen, daß die Häufigkeiten von 1,7% und 3,9% prozentual so stark voneinander abweichen, daß ein Trend hin zur Signifikanz entsteht, die absolute Differenz ist hierbei aufgrund der insgesamt geringen Häufigkeit aber nicht groß.

Von umso größerer Relevanz für eine repräsentative Studie ist hierbei eine ausreichend hohe Anzahl an Probanden. So ist die Anzahl von 708 Studienteilnehmern, darunter 421 Kontrollen und 287 Patienten, im Vergleich mit anderen Schizophrenie-Assoziationsstudien der letzten Jahre eine gute Ausgangslage für eine aussagekräftige Untersuchung (Shi et al. 2008). Bei isolierter Betrachtung der Allelverteilung wird die Prüfgröße zudem gegenüber der Genotypverteilung noch um das Doppelte erhöht.

Ebenso wichtig ist ethnische Homogenität der Probanden. Da die Allel- und Genotypverteilung zwischen verschiedenen Ethnien stark variieren kann, wie es auch bei den untersuchten Polymorphismen der Fall ist (Tab. 21, 22), kann eine Assoziation mit einer Ethnie eine Assoziation mit der Erkrankung simulieren, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt (Bailer et al. 2002). Diese Gefahr wurde in vorliegender Studie minimiert, da es sich bei den Probanden ausschließlich um Menschen des kaukasischen Typs aus der Region München mit deutscher Abstammung handelt.

Diskussion

Tab 21: Allel- und Genotyp-Verteilung des SNP rs1467664 der Kontroll- und Patientengruppe im Vergleich mit verschiedenen Ethnien (International HapMap Project 2010)

| | SNP rs1467664 | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|------------|------------|
| | Genotyp A/A | Genotyp A/G | Genotyp G/G | Allel A | Allel G |
| Europäer (west-/nordeuropäischer Abstammung aus Utah) | 73,5% | 23,9% | 2,7% | 85,4% | 14,6% |
| Japaner (aus Tokyo) | 51,2% | 38,4% | 10,5% | 70,3% | 29,7% |
| Afrikaner (Yuroba aus Ibadan in Nigeria) | 57,5% | 34,5% | 0,8% | 74,8% | 25,2% |
| Chinesen (Han-Chinesen aus Peking) | 64,3% | 28,6% | 0,71% | 78,6% | 21,4% |
| Kontrollen | 73,2% | 25,2% | 1,7% | 85,7% | 14,3% |
| Patienten | 71,6% | 25,5% | 3,9% | 83,9% | 16,1% |

Tab 22: Allel- und Genotyp-Verteilung des SNP rs2134095 der Kontroll- und Patientengruppe im Vergleich mit verschiedenen Ethnien (International HapMap Project 2010)

| | SNP rs2134095 | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|------------|------------|
| | Genotyp T/T | Genotyp T/C | Genotyp C/C | Allel T | Allel C |
| Europäer (west-/nordeuropäischer Abstammung aus Utah) | 43,4% | 47,8% | 8,8% | 67,3% | 32,7% |
| Japaner (aus Tokyo) | 11,6% | 47,7% | 40,7% | 35,5% | 64,5% |
| Afrikaner (Yuroba aus Ibadan in Nigeria) | 5,0% | 31,9% | 63,1% | 20,4% | 79,6% |
| Chinesen (Han-Chinesen aus Peking) | 51,2% | 30,2% | 18,6% | 66,3% | 33,7% |
| Kontrollen | 43,4% | 46,3% | 10,3% | 66,5% | 33,5% |
| Patienten | 44,9% | 44,3% | 10,8% | 67,1% | 32,9% |

Diskussion

Da erste Anzeichen einer Schizophrenie durchschnittlich im Alter von 24 Jahren auftreten, bei Frauen dabei drei bis vier Jahre später als bei Männern (Häfner et al. 1998), kann das Alter der Probanden der Kontrollgruppe, beginnend bei neunzehn Jahren, zu falsch-negativen Ergebnissen führen, weil einige von ihnen im Laufe ihres Lebens erst noch Symptome der Schizophrenie oder anderer psychischer Erkrankungen entwickeln können. Allerdings lag das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe bei über dreißig Jahren und damit deutlich über dem durchschnittlichen Erkrankungsalter.

Das bei der Auswahl der Studienteilnehmer verwendete „Strukturierte Klinische Interview“ (SKID) zeichnet sich durch sehr hohe Reliabilität bei der Diagnostik psychischer Störungen aus und stellte ein geeignetes Verfahren zur Ermittlung von Kontroll- wie Fallgruppe dar (Lobbestael et al. 2011).

Die Verwendung des „Family History Assessment Module“ (FHAM) bei der Auswahl der Kontrollpersonen zur Untersuchung derer Verwandten ersten Grades war eine probate Methode, um eine „genetischer Vorbelastung“ hinsichtlich psychischer Erkrankungen zu minimieren (Rice et al. 1995).

Daß die Patienten sowohl dem undifferenzierten, als auch dem desorganisierten oder paranoiden Typs der Schizophrenie zuzuordnen sind, kann zu einer Abschwächung von Ergebnissen führen, da eine Unterschiedlichkeit in der Ätiologie möglich ist.

2. Studien über RAR/RXR im Kontext der Schizophrenie

Bisher wurden zwei Assoziationsstudien publiziert, um eine Verbindung zwischen Retinoidrezeptoren und Schizophrenie zu untersuchen:

Die umfassendste Untersuchung der RAR/RXR-Gene fand innerhalb einer britisch-amerikanischen Studie aus dem Jahre 2005 statt (Feng et al. 2005).

Die DNA von 192 Patienten, 100 waren an Schizophrenie, 24 an BPD, 24 an ADHD, 24 an Autismus und 20 an Alkoholismus erkrankt, wurden im Bereich aller sechs RAR/RXR-Untereinheiten und des NURR1-Gens mittels SSCP nach Mutationen bzw. Polymorphismen abgesucht.

Diskussion

Innerhalb der drei Gene RAR beta, RAR gamma und RXR gamma konnten jeweils ein Polymorphismus mit Aminosäurenaustausch entdeckt werden.

Der Polymorphismus des RAR gamma-Gens (K341R) fand sich nur bei einem BPD-Patienten, nicht innerhalb der anderen Erkrankten, jedoch bei zwei von 98 Kontrollprobanden.

Die Variante des RXR gamma-Gens (V59L) hatte ein Schizophreniepatient, keiner der restlichen Patienten und keiner der 94 Kontrollen.

Der Polymorphismus des RAR beta-Gens (N307T) wurde bei drei Patienten entdeckt, und zwar nur innerhalb der Schizophreniegruppe, weswegen eine anschließende ergänzende Fall-Kontrollstudie mit 398 Schizophreniepatienten und 509 ethnisch ähnlichen Kontrollen durchgeführt wurde. Da das seltenere Allel noch jeweils einmal pro Gruppe gefunden wurde, kam das Ergebnis zusammenfassend einem nicht-signifikanten Trend nahe ($p=0,21$) (Feng et al. 2005).

Bei RAR alpha, RAR beta, RAR gamma und RXR alpha konnte zudem innerhalb der Exons jeweils ein Polymorphismus ohne Aminosäurenaustausch, auf RXR beta konnten zwei identifiziert werden. Auf RXR gamma fanden sich sogar vier, darunter auch der in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus rs2134095 auf Exon 8. Doch traten diese in ähnlicher Häufigkeit bei den Schizophrenen wie bei den restlichen Patienten auf.

In einer japanischen Mutations- und Assoziationsstudie von 2002 wurde das RXR beta-Gen und zwei seiner heterodimeren Partnergene, das NR4A2-Gen und PPARG-Gen, auf ihren Einfluß auf die Entstehung von Schizophrenie und Alkoholismus hin untersucht (Ishiguro et al. 2002).

Die Gruppe der Schizophreniepatienten bestand aus 296 nicht verwandten Japanern beiderlei Geschlechts zwischen 18 und 80 Jahren. Dem gegenüber standen als Kontrollgruppe 186 gesunde Japaner zwischen 32 und 65 Jahren.

Auf der Suche nach Polymorphismen innerhalb des RXR beta-Gens, das auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert ist, konnte auf Exon 2 ein aminosäurenvariierender Polymorphismus entdeckt werden (Val95Ala).

Jedoch lag die Häufigkeit des selteneren Allels sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den Schizophrenen jeweils bei ca. 2%. Somit konnte kein Hinweis auf eine Verbindung des RXR beta mit der Ätiologie der Schizophrenie erbracht werden.

3. Vergleich der Studien

Während in der vorliegenden Studie zwei ausgewählte, bereits bekannte Polymorphismen innerhalb des RXR gamma betrachtet wurden, analysierten Ishiguro et al. das gesamte RXR beta-Gen (Ishiguro et al. 2002). Feng et al. suchten bei allen sechs Retinoidrezeptorgenen nach Mutationen (Feng et al. 2005), wobei sie die Methode der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP) benutzten. Da einige Polymorphismen keine Konformationsänderung des Einzelstranges auslösen, liegt die Sensitivität dieses Verfahrens bei höchstens 80% (Murken et al. 2006).

Während Feng et al. lediglich die gefundenen Missense-Mutationen einer echten Fall-Kontroll-Untersuchung unterzogen, verglichen sie bei den restlichen Polymorphismen deren Häufigkeit innerhalb der Schizophrenen mit der innerhalb anderer Patienten (Feng et al. 2005). Hauptaugenmerk wurde auf eine Missense-Mutation auf RAR gamma gelegt. Die Teilnehmerzahl bei dieser Anschlußstudie war ähnlich hoch wie in der eigenen Studie, sowohl bei Kontrollen, als auch bei Patienten. Dabei wurde hier auf ethnische Homogenität Wert gelegt. Es wurden nur Amerikaner europäischer Abstammung ausgewählt, da die Mutationen ausschließlich in deren Kreis entdeckt wurden, wohingegen in der Ausgangsstudie auch Afroamerikaner als Patienten teilnahmen.

Ishiguro et al. verglichen die Häufigkeit der einzigen auf RXR beta gefundenen Missense-Mutation bei 296 schizophrenen, 186 gesunden, als auch 190 alkoholabhängigen Japanern (Ishiguro et al. 2002). Die Homogenität der Ethnizität ist gewahrt, die Teilnehmerzahl ist im Vergleich mit vorliegender Untersuchung ähnlich groß, was die Schizophreniepatienten betrifft, aber weniger als halb so groß hinsichtlich der Kontrollprobanden.

In keiner der Studien konnte eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie festgestellt werden. Doch kam die amerikanische Studie bei einem Polymorphismus des RAR beta-Gens (N307T) zu einem Ergebnis, das leichte Tendenz zu einem Trend zeigte ($p=21$) (Feng et al. 2005), in der eigenen Studie war bei rs1467664 bei homozygoter Konstellation des selteneren Allels sogar ein deutlicher Trend zu erkennen ($p=0.066$).

4. Studien über NRA4 im Kontext der Schizophrenie

Bis jetzt liegen nur Andeutungen einer Assoziation der Retinoidrezeptoren mit Schizophrenie vor, was sicherlich auch an der absolut gesehen geringen Anzahl von Studien liegt, die sich mit diesem Thema befassen.

Durchaus denkbar ist, daß die Änderung der Retinoidsignale, welche durch einen langfristig veränderten Dopaminhaushalt Schizophrenie auslösen können, nicht auf einer strukturellen Variante von Retinoidrezeptoren basiert, sondern lediglich auf einem unterschiedlichen Zusammenwirken innerhalb heterodimerer Komplexe (Levesque et al. 2007). So legen neuere Untersuchungen nahe, daß in Striatumzellen RAR beta und RXR gamma gleichermaßen zu finden sind und RAR-RXR-Komplexe bilden, innerhalb derer RXR der stumme Partner ist. Kommt es zu einem Austausch des RAR durch Nur77, einem nuklearen Hormonrezeptor der orphanen NR4A Untergruppe, erhält nun plötzlich RXR den aktiven Part. Infolgedessen können nun RXR-selektive Liganden an den Komplex andocken, die bislang vorherrschende All-trans-Retinsäure hat keinerlei Einflußmöglichkeit mehr. So kann durch die Induktion von Nur77 die Signalgebung des RXR maßgeblich verändert werden, ohne diesen an sich zu verändern.

Belege hierfür bringen Analysen von Post-mortem-Gehirnen Schizophrener, in denen eine verringerte Expression von Nur77 im präfrontalen Kortex feststellbar war (Xing et al. 2006). Auch zeigen Tierversuche an Nur77(-/-)-Mäusen eine geringere Wirkung von Haloperidol auf Enkephalin- und Neurotensin-mRNA-Konzentrationen (Ethier et al. 2004). So konnte in anderen Versuchen gezeigt werden, daß Haloperidol die m-RNA-Levels von Nur77 in speziellen Enkephalin-exprimierenden Striatumzellen erhöhen kann (Beaudry et al. 2000).

Diskussion

So fanden in den letzten Jahren Untersuchungen statt, die zusätzlich oder sogar ausschließlich die Untersuchung der orphanen NR4A-Untergruppe zum Ziel hatten, zu der Nurr1 (NR4A1), Nur77 (NR4A2) und Nor1 (NR4A3) gehören. Sie sind Teil der nuklearen Hormon-Rezeptor-Über-Familie. Sie sind an der Aktivierung von Genexpression beteiligt ohne eigene Ligandenbindung, reagieren dagegen auf physiologische und physische Reize. Sie werden weitverbreitet im zentralen Nervensystem exprimiert, unter anderem in dopaminergen Neuronen. Sie treten als Monomere und Homodimere auf, Nurr1 und Nur77 auch als Heterodimere mit RXR (Maxwell, Muscat 2006).

In der Studie von Feng et al. wurde das humane Nurr1-Gen mituntersucht (Feng et al. 2005). Zwei unterschiedliche SSCP-Polymorphismen auf Exon 4(IVS4-129ST) und Exon 6(IVS6+17ins9) konnten entdeckt werden, jeweils an einem, bzw. drei der 192 Schizophreniepatienten; beide haben keinen Einfluß auf eine Aminosäureänderung.

In der Studie von Ishiguro et al. wurden zwei andere Polymorphismen entdeckt, die sich jeweils am anderen äußeren Ende des Nur77-Gens befinden, jedoch wurden keine Mutationen gefunden, die in Verbindung mit einem Aminosäureaustausch stehen. Sowohl der -2922(C)2-3-Polymorphismus, der sich in der Promoterregion befindet, als auch Ex8+657(CA)9-10, der jenseits von Exon 8 liegt, waren auf Schizophrene und Kontrollen in etwa gleichmäßig verteilt, so daß hier keine signifikante Verbindung zur Schizophrenie festgestellt werden konnte.

In einer japanischen Studie aus dem Jahr 2003 wurden 180 Schizophreniepatienten und 180 Kontrollen, ethnische Japaner, hinsichtlich des Gens Nur77 untersucht (Iwayama-Shigeno et al. 2003). Benutzt wurden die Polymorphismen -2922(C)2-3, IVS6+17ins9 und Ex8+657(CA)9-10. Dabei konnte keine signifikante Assoziation zur Schizophrenie erkannt werden. Da eine starke Kopplung untereinander festgestellt wurde, wurden zusätzlich die Haplotypen aus jeweils zwei dieser Polymorphismen bzw. aus allen dreien untersucht. Obwohl man teilweise zu Ergebnissen kam, die stark von bisherigen

Diskussion

abwichen (Ishiguro et al. 2002), konnte hierbei kein signifikanter Hinweis entdeckt werden.

In einer schwedisch-amerikanischen Studie aus dem Jahre 2003 wurden drei unabhängige SNPs innerhalb der Promoterregion des NURR1-Gens hinsichtlich ihrer Assoziation mit Schizophrenie getestet (Carmine et al. 2003). Beteiligt waren 134 Patienten und 207 Kontrollen aus der weißen Bevölkerung aus der Region Stockholm. Zwei Polymorphismen zeigten keine Assoziation, bei einem zeigte sich ein leicht gehäuftes Auftreten innerhalb der Schizophreniepatienten, was allerdings keine statistische Signifikanz darstellte.

Anschließend wurde letzterer SNP nochmals an 141 Patienten und 139 Kontrollen aus Pittsburgh untersucht. Hierbei kam es zu keinem signifikanten Ergebnis, keine Tendenz war erkennbar.

2004 wurden in einer portugiesisch-brasilianischen Studie sechs Mutationen auf dem Nur77-Gen untersucht. Zwei davon wurden zuletzt innerhalb einer Studie entdeckt, die sich mit Parkinson befaßte, die anderen wurden bereits im Zusammenhang mit Schizophrenie und bipolarer Störung beschrieben. Eine Mutation befindet sich in der Promoter-Region, zwei auf Exon 1 und drei auf Exon 3.

Eingeschlossen wurden 176 portugiesische und 82 brasilianische Schizophreniepatienten und 105 portugiesische und 85 brasilianische Kontrollen, allesamt kaukasischen Typs. In keinem Falle, weder bei Gesunden noch bei Kranken, konnte eine jener Mutationen gefunden werden (Ruano et al. 2004).

5. Studien über RXR gamma

Der Retinoid-X-Rezeptor gamma stand abseits der Schizophrenie des öfteren im Focus von Untersuchungen:

Diskussion

In einer amerikanischen Studie aus dem Jahre 2002 wurde RXR gamma im Zusammenhang mit **Typ-2-Diabetes** und **Familiärer Hyperlipidämie** untersucht (Wang et al. 2002), da er hierfür ein funktionelles und positionelles Kandidatengen darstellt. Beide Erkrankungen werden mit Chromosom 1q21-24 in Verbindung gebracht; außerdem scheint RXR gamma starken Einfluß auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel zu haben, vor allem wenn sie als Heterodimere mit PPAR alpha und PPAR gamma als Partner agieren.

Hierbei konnten 14 SNPs auf RXR gamma gefunden werden, davon nur drei auf Exons (3, 6 und 8), keiner Aminosäuren alterierend. Insgesamt zeigten drei SNPs in ersten Tests Assoziation mit Typ-2-Diabetes, ein weiterer deutliche Tendenz.

Hinsichtlich der Weitergabe dieser vier Polymorphismen an die Nachkommen wurden 63 Familien nordeuropäischer Herkunft untersucht, die von Diabetes betroffen waren. Von einem seltenen Haplotypen abgesehen, konnte keine Assoziation festgestellt werden. Auch der anschließende Glucose-Toleranztest ergab keine signifikanten Zusammenhänge.

Zu anderem Ergebnis kamen andere quantitative Tests, die sich mit dem Lipidstoffwechsel befaßten. So zeigten drei SNPs Signifikanz hinsichtlich ihrer Konzentration freier Fettsäuren, zwei beim Test der Triglyceridlevels. Diese Assoziationen hatten auch Bestand, als diese Tests an Nicht-Diabetikern wiederholt wurden.

Weitere positive Tests im Bereich der pankreatischen B-Zellen lassen einen Einfluß des RXR gamma auf Typ-2-Diabetes über die Fehlregulierung des Lipid-Haushalts vermuten (Wang et al. 2002).

Die Entstehung einer **Diabetischen Nephropathologie** (DN) bei Diabetes-mellitus-Patienten, die Hauptursache für dialysepflichtige Niereninsuffizienz, scheint stark von genetischen Faktoren abzuhängen. Daher untersuchte eine chinesische Studie (Hsieh et al. 2006) unter Hanchinesen 231 SNPs innerhalb von 28 funktionellen Kandidatengen auf Assoziation mit DN, wobei 144 Diabetespatienten mit DN mit 120 Diabetespatienten ohne DN als Kontrollen verglichen wurden; darunter auch RXR gamma in der Kategorie Zellwachstum und Reifung.

Diskussion

Als Ergebnis konnten 13 SNPs aus 8 Genen signifikant mit Diabetischer Nephropathologie assoziiert werden. Darunter war RXR gamma mit zwei SNPs vertreten.

In zweiter Instanz wurden Gen-Gen-Interaktionen anhand der assoziierten SNPs analysiert. Auch hierbei wurde ein deutliches Augenmerk auf den RXR gamma und sein Zusammenspiel mit dem Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) gelegt, welcher eine ähnliche Rolle bei Zellwachstum, Apoptose und Tumorentstehung spielen kann.

Bei **Peripherer Schilddrüsenhormonresistenz** (RTH) werden zwar genügend Thyroidhormone produziert, können jedoch nicht auf den Körper wirken. Ausschlaggebend hierbei ist in 90% aller Fälle eine Mutation des T3-Rezeptor-b-Gens (TR beta). Bei den restlichen Erkrankten ist dieses Gen unverändert intakt. Da eine Kopplung in zwei Familien zum Retinoid-X-Rezeptor gamma führte, den zudem der T3-Rezeptor-b zur Modulierung von Zielgenen als heterodimeren Partner nutzt, untersuchte eine italienische Studie 2004 den RXR gamma mithilfe der PCR-SSCP-Methode an vier RTH-Patienten ohne TR-beta-Mutation, zwei Männern und zwei Frauen zwischen 35 und 54 Jahren (Romeo et al. 2004). Obwohl alle 10 Exons, die UTR- und die Promotorregion nach Mutationen durchsucht wurden, stieß man lediglich auf zwei SNPs, die jeweils bei einem der Patienten zu finden waren. Daraufhin wurde eine Kontrollgruppe von 60 Gesunden (Durchschnittsalter 50 Jahre) ebenfalls nach diesen beiden SNPs hin untersucht, wobei diese mit einer Frequenz von 50% und 24% auftraten. Als die Verwandtschaft eines der beiden betroffenen Patienten getestet wurde, fand man bei einem von beiden Brüdern und beim Vater den Polymorphismus, beide sind jedoch gesund.

Da man bei den Patienten auf keine Mutationen stieß, die gefundenen SNPs bei den Kontrollen in ähnlicher Weise vertreten waren, geht man davon aus, daß RXR gamma für diese RTH-Patienten keine Rolle spielen dürfte, wenngleich er in seiner Rolle als Co-Aktivator von TR beta ein wichtiger Kandidat für RTH bleibt.

Die Ergebnisse der Studien über RXR gamma und die Entstehung von Typ-2-Diabetes, Familiärer Hyperlipidämie, Diabetischer Nephropathologie und Peripherer Schilddrüsen-

hormonresistenz sind zum Teil vielversprechend. Ein Zusammenhang mit der Ätiologie der Schizophrenie konnte bisher nicht gefunden werden.

6. Fazit

Strukturelle genetische Änderungen innerhalb der Retinoidrezeptorgene scheinen keine Hauptrolle in der Ätiologie der Schizophrenie zu spielen, da bisher keine signifikante Assoziation zwischen Polymorphismen innerhalb dieser Rezeptoren und Schizophrenie gefunden werden konnte. Dies gilt für bisherige Studien genauso wie für die vorliegende Untersuchung, in der zwei SNPs (rs1467664, rs2134095) innerhalb des Retinoid-X-Rezeptors gamma nicht signifikant mit Schizophrenie in Verbindung gebracht werden konnten. Dabei stellte rs1467664 allerdings in homozygoter Konstellation des selteneren Allels einen positiven Trend hin zur Signifikanz dar.

Während die Häufigkeit sogenannter „stiller“ Polymorphismen auf Exons wie Introns in etwa derer auf anderen Genen entspricht, sind aminosäurenverändernde Polymorphismen innerhalb der RAR-RXR-Gene relativ selten. Da gerade diese starken Einfluß auf den Organismus durch die modifizierte Synthese von Proteinen nehmen können, etwa in der Ätiologie einer Erkrankung, könnte deren geringe Anzahl ein Hinweis auf geringeren Einfluß der RAR-RXR-Gene auf die Entstehung der Schizophrenie sein, zumindest was die Relevanz genetischer Varianten betrifft.

Da sich die Schizophrenie zunehmend als sehr heterogene und komplexe Erkrankung zeigt, sowohl was den Phänotyp, den beiderseitigen Einfluß von Umwelt und Genetik, als auch das Zusammenspiel von zahlreichen Genen betrifft, ist eine wichtige Rolle der Retinoidrezeptoren in der Entstehung der Schizophrenie nicht ausgeschlossen. Dabei ist sowohl an eine größere Relevanz innerhalb einer kleineren Fraktion der schizophrenen Erkrankungen, als auch als Regulativ innerhalb eines polygenetischen oder multifaktoriellen Systems denkbar. So ist ein möglicher „geringer“ genetischer Einfluß von vielen verschiedenen Genen aber wiederum schwer zu detektieren.

Diskussion

Für weitergehende Fall-/Kontrollstudien ist der Assoziationsstudie durch ihre höhere Sensibilität gegenüber Genen mit geringem Einfluß im Vergleich zu Kopplungsstudien der Vorzug zu geben. Die aussichtsreichsten Kandidaten innerhalb der Retinoidrezeptorgene sind RAR beta mit dem Marker N307T aus der Studie von Jeng et al. (2006), und RXR gamma mit SNP rs1467664, der auch in vorliegender Arbeit untersucht wurde und einen positiven Trend aufwies.

Ein weiteres geeignetes Studiendesign können Tierversuche mit Knock-in-Mäusen darstellen. Es wird das Verhalten von Klonen studiert, die Träger eines bestimmten Genotyps sind, etwa einer Variante eines Polymorphismus. Dies könnte im Fall des RXR gamma bei rs1467664 der Genotyp G/G sein, die homozygote Kombination des selteneren Allels, die den positiven Trend in vorliegender Arbeit zeigte.

Eine alternative Herangehensweise präsentiert das Modell der „Endophänotypen“. Dabei handelt es sich um biologische Marker, die erblich und quantitativ erfaßbar sein müssen. Körperliche subklinische Auffälligkeiten, sogenannte „soft signs“, werden an Schizophrenen, deren gesunder Verwandtschaft ersten Grades und an Kontrollen verglichen. Im EEG werden durch auditive und olfaktorische Reize evozierte Hirnpotentiale wie etwa N100 und P200 verglichen, die an unterschiedlichen Prozessen der Reizverarbeitung beteiligt sind (Turetsky et al. 2008a, Turetsky et al. 2008b). Stellt sich ein deutlicher Zusammenhang der Ergebnisse von Kranken und deren Verwandten heraus, kann von einem Vulnerabilitätsmarker gesprochen werden, einem „Endophänotypen“. Dies beschränkt sich aber nicht nur auf meßbare Nervimpulse. So können auch bestimmte Charaktereigenschaften als biologische Marker dienen (Smith et al. 2008).

Aus wissenschaftlicher Betrachtung liegt der Endophänotyp zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp und kann daher in seiner Bindegliedfunktion zwischen Symptom- und Molekularebene behilflich sein, Klarheit in die unterschiedlichsten klinischen Erscheinungsbilder der Schizophrenie zu bringen. Andererseits könnte er es ermöglichen, die Relevanz genetischer Variationen mit kleinem Einfluß leichter in den Gesamtzusammenhang multifaktorieller Wirkungsweisen einzuordnen.

Diskussion

Zwischen RXR gamma und dem Phänotyp der Schizophrenie könnten als Bindeglied Zeichen eines gestörten Arbeitsgedächtnisses stehen. Zum einen besteht ein Zusammenhang zwischen Defiziten des Arbeitsgedächtnisses und Deaktivierung des RXR gamma, zum anderen sind kognitive Störungen als Folge eines beeinträchtigten Arbeitsgedächtnisses ein häufiger Befund bei schizophrenen Patienten (Pukrop et al. 2003); da zudem gesunde Verwandte ersten Grades subtile bis ausgeprägtere Defizite dieser Art aufweisen können (Conklin et al. 2005), mag die Betrachtung eines gestörten Arbeitsgedächtnisses als Endophänotyp hilfreich sein, mögliche Mechanismen zur Auslösung von Schizophrenie durch Veränderungen des RXR gamma aufzuzeigen.

G Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| A | Adenosin |
| ADHD | Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung |
| Ala | Alanin |
| ALDH | Aldehyd-Dehydrogenase |
| Bp | Basenpaare |
| BPD | Borderline-Persönlichkeitsstörung |
| C | Cytosin |
| cM | Centimorgan |
| COMT | Catechol-O-methyltransferase |
| CBP | CREB bindendes Protein |
| CREB | cAMP response element-binding protein (Transkriptionsfaktor) |
| Cys | Cystein |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| df | degrees of freedom |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dTTP | Desoxytymidintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| D2/D3 | Dopamin-2-Rezeptorgen/Dopamin-3-Rezeptorgen |
| DRD2/DRD 3 | Dopamin-2-Rezeptorgen/Dopamin-3-Rezeptorgen |
| DSM- IV | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, vierte Edition, American Psychiatric Association |
| DTNBP1 | Dysbindin |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EEG | Elektroenzephalografie, -gramm |
| Ex | Exon |
| f | forward, vorwärts |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|--|
| F | Inzuchtkoeffizient |
| FHAM | Family History Assessment Module |
| G | Guanin |
| Gly | Glycin |
| G-Protein | Guanin-Nukleotid Bindungsprotein |
| Grm | metabotroper Glutamatrezeptor |
| GWA(S) | genomweite Assoziationsstudie |
| HAT | Histonacetyltransferase |
| HCl | Salzsäure |
| HDAC | Histondeacetylase |
| 5-HT1A/2A- Rezeptor | Serotonin Rezeptortyp |
| ICD | International Classification of Diseases, Klassifikationssystem für Krankheiten in der Weltgesundheitsorganisation |
| ID | Identifikator, Kennung |
| kb | Kilobasenpaare |
| LSD | Lysergsäurediethylamid |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| M | Molar |
| Met | Methionin |
| Mg²⁺ | Magnesium |
| MgCl₂ | Magnesiumchlorid |
| mM | Millimolar |
| mRNA | messenger RNA, Boten-RNA |
| n | Probandenzahl |
| N100 | evoziertes Potential im EEG |
| NADH | reduzierte Form des NAD |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NAD⁺ | oxidierte Form des NAD |
| N-CoR | nuclear receptor co-repressor |
| (NH₄)₂SO₄ | Ammoniumsulfat |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| Nor1 | neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1), NR4A3 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3) |
| NRG 1 | Neuregulin 1 |
| Nur77 | nerve Growth factor IB (NGFIB), NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) |
| NURR1 | nuclear receptor related 1 protein, NR4A2 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2) |
| O | Element Sauerstoff |
| OH | Hydroxygruppe |
| p | a) Signifikanz, p-Wert b) kurzer („petit“) Arm eines Chromosoms |
| P200 | evoziertes Potential im EEG |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| pH | “pondus Hydrogenii“, pH-Wert: Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung |
| pmol | Picomol |
| PPAR | peroxisome proliferator-activated receptor |
| q | langer Arm eines Chromosoms |
| QTL | Quantitative Trait Locus |
| RAR | retinoic acid receptor |
| RARE | Retinoic acid response element |
| r | reverse, rückwärts |
| RGS 4 | Regulator of G-Protein signaling 4 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute |
| rs | reference SNP (RefSNP), Referenznummer eines SNP |
| RTH | Periphere Schilddrüsenhormonresistenz |
| RXR | Retinoid-X-Rezeptor |
| RXRE | retinoid X response element |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| SCID | Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse |
| Ser | Serin |
| SKID | Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse |
| SMRT | Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-hormone receptors |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid- Polymorphismus |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| SSCP | Einzelstrang-Konformationspolymorphismus |
| Syn. | Synonym |
| T | Thymin |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TR | Thyroidhormonrezeptor |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol, Tromethamin |
| TTR | Transthyretin |
| U | Unit, Einheit der Enzymaktivität |
| UTR | untranslatierter Bereich, nicht codierende Randbereiche einer mRNA |
| UV | ultraviolett |
| Val | Valin |
| µl | Microliter |

H Literaturverzeichnis

Abdolmaleky HM, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT (2004) Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res* 67(1):53-62.

American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders*, vierte Edition

Badner JA, Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7(4):405-11.

Bailer U, Aschauer H, Kasper S (2002) Genetik der Schizophrenie. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 3 (3), 25-31.

Beaudry G, Langlois MC, Weppe I, Rouillard C, Lévesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75(4):1694-702.

Berry N, Jobanputra V, Pal H (2003) Molecular genetics of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci*. 28(6):415-29.

Benes FM, Sorensen I, Bird ED (1991) Reduced neuronal size in posterior hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Bull* 17(4):597-608.

Bleuler E (1908) Die Prognose der Dementia praecox (Schizophreniegruppe). *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychischgerichtliche Medizin* 65:436-464.

Literaturverzeichnis

Black JE, Kodish IM, Grossman AW, Klintsova AY, Orlovskaya D, Vostrikov V, Uranova N, Greenough WT (2004) Pathology of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161(4):742-4.

Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SB, al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ (1994) Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem* 269(24):16559-65.

Blast (2002) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/BLAST/>

Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, MD; Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, Babulas VP, Susser ES (2004) Serologic Evidence of Prenatal Influenza in the Etiology of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 61:774-780.

Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS (2000) Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288(5466):678-82.

Cantor-Graae E, Selten JP (2005) Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry* 162(1):12-24.

Carmin A, Buervenich S, Galter D, Jönsson EG, Sedvall GC, Farde L, Gustavsson JP, Bergman H, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Anvret M, Sydow O, Olson L (2002) NURR1 promoter polymorphisms: Parkinson's disease, schizophrenia, and personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B(1):51-7.

Chen X, Dunham C, Kendler S, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2004) Regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) gene is associated with schizophrenia in Irish high density families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129B(1):23-6.

Literaturverzeichnis

Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B K T, Ferrell RE, Middleton FA, Devlin B, Levitt P, Lewis DA, Nimgaonkar VL (2002) Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 11(12):1373-80.

Chen H, Namkung MJ, Juchau MR (1995) Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. *Biochem Pharmacol* 50(8):1257-64.

Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguère V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21(6):1353-61.

Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H (2004) Expert Reviews in Molecular Medicine, Vol. 6; Issue 25; 30, Cambridge University Press

Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, Sarais L, Fadda F (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115(2):475-82.

Conklin HM, Curtis CE, Calkins ME, Iacono WG (2005) Working memory functioning in schizophrenia patients and their first-degree relatives: cognitive functioning shedding light on etiology. *Neuropsychologia* 43(6):930-42.

Cordell HJ (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet.* 11(20):2463-8.

Crow TJ (1980) Molecular pathology of schizophrenia – more than one disease process. *British Medical Journal* 280: 66-68.

Dorak M T (2008) Genetic Epidemiology. <http://www.dorak.info/epi/genetepi.html>

Literaturverzeichnis

Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, Yakub I, Callicott JH, Hariri AR, Mattay VS, Bertolino A, Hyde TM, Shannon-Weickert C, Akil M, Crook J, Vakkalanka RK, Balkissoon R, Gibbs RA, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34):12604-9.

Egea PF, Mitschler A, Rochel N, Ruff M, Chambon P, Moras D (2000) Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J* 19(11):2592-601.

Escamilla M, Hare E, Dassori AM, Peralta JM, Ontiveros A, Nicolini H, Raventós H, Medina R, Mendoza R, Jerez A, Muñoz R, Almasy L (2009) A schizophrenia gene locus on chromosome 17q21 in a new set of families of Mexican and central american ancestry: evidence from the NIMH Genetics of schizophrenia in latino populations study. *Am J Psychiatry* 166(4):442-9.

Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R (2003) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res* 145(1-2):37-49.

Ethier I, Beaudry G, St-Hilaire M, Milbrandt J, Rouillard C, Lévesque D (2004) The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression. *Neuropsychopharmacology* 29(2):335-46.

Falkai P, Honer WG, David S, Bogerts B, Majtenyi C, Bayer TA (1999) No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(1):48-53.

Literaturverzeichnis

Fan H, Zhang F, Xu Y, Huang X, Sun G, Song Y, Long H, Liu P (2010) An association study of DRD2 gene polymorphisms with schizophrenia in a Chinese Han population. *Neurosci Lett* 477(2):53-6.

Farmer AE, McGuffin P, Gottesman II (1987) Twin concordance for DSM-III schizophrenia. Scrutinizing the validity of the definition. *Arch Gen Psychiatry* 44(7):634-41.

Feng J, Chen J, Yan J, Jones IR, Craddock N, Cook EH Jr, Goldman D, Heston LL, Sommer SS. (2005) Structural variants in the retinoid receptor genes in patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B(1):50-3.

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JB (1996) *Structured Clinical Interview for the DSM-IV Axis I Disorders*

Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Olincy A, Davis A, Polymeropoulos M, Holik J, Hopkins J, Hoff M, Rosenthal J, Waldo MC, Reimherr F, Wender P, Yaw J, Young DA, Breese CR, Adams C, Patterson D, Adler LE, Kruglyak L, Leonard S, Byerley W (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2):587-92.

Fujii Y, Shibata H, Kikuta R, Makino C, Tani A, Hirata N, Shibata A, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y (2003) Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 13(2):71-6.

Gill M, Vallada H, Collier D, Sham P, Holmans P, Murray R, McGuffin P, Nanko S, Owen M, Antonarakis S, Housman D, Kazazian H, Nestadt G, Pulver AE, Straub RE, MacLean CJ, Walsh D, Kendler KS, DeLisi L, Polymeropoulos M, Coon H, Byerley W, Lofthouse R, Gershon E, Read CM, et al. (1996) A combined analysis of D22S278 marker alleles in affected sib-pairs: support for a susceptibility locus for schizophrenia at chromosome

Literaturverzeichnis

22q12. Schizophrenia Collaborative Linkage Group (Chromosome 22). *Am J Med Genet* 67(1):40-5.

Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT (2003) Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8(11):911-5.

Goldman-Rakic PS (1994) Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6(4):348-57.

Goodman AB (1996) Congenital anomalies in relatives of schizophrenic probands may indicate a retinoid pathology. *Schizophr Res* 19(2-3):163-70.

Goodman AB (1998) Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13):7240-4.

Gottesman II (1991) *Schizophrenia genesis: The origins of madness*. New York, W.H. Freeman

Gourion D, Gourevitch R, Leprovost JB, Olié H, Ilo JP, Krebs MO (2004) [Neurodevelopmental hypothesis in schizophrenia]. *Encephale* 30(2):109-18.

Häfner H, an der Heiden W, Behrens S, Gattaz WF, Hambrecht M, Löffler W, Maurer K, Munk-Jørgensen P, Nowotny B, Riecher-Rössler A, Stein A (1998) Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24(1):99-113.

Harrison G, Gunnell D, Glazebrook C, Page K, Kwiecinski R (2001) Association between schizophrenia and social inequality at birth: case-control study. *Br J Psychiatry* 179:346-350.

Literaturverzeichnis

Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1):40-68.

Heston LL (1966) Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry* 112(489):819-25.

Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992) 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68(2):397-406.

Highley JR, Walker MA, Crow TJ, Esiri MM, Harrison PJ (2003) Low medial and lateral right pulvinar volumes in schizophrenia: a postmortem study. *Am J Psychiatry* 160(6):1177-9.

Hsieh CH, Liang KH, Hung YJ, Huang LC, Pei D, Liao YT, Kuo SW, Bey MS, Chen JL, Chen EY (2006) Analysis of epistasis for diabetic nephropathy among type 2 diabetic patients. *Hum Mol Genet* 15(18):2701-8.

International HapMap Project (2010) <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

Ishiguro H, Okubo Y, Ohtsuki T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. (2002) Mutation analysis of the retinoid X receptor beta, nuclear-related receptor 1, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha genes in schizophrenia and alcohol dependence: possible haplotype association of nuclear-related receptor 1 gene to alcohol dependence. *Am J Med Genet* 114(1):15-23.

Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Toyota T, Shimizu H, Hattori E, Yoshitsugu K, Fujisawa T, Yoshida Y, Kobayashi T, Toru M, Kurumaji A, Detera-Wadleigh S, Shi J, Gershon ES, Liu C (2008) Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes. *Schizophr Res* 104(1-3):96-107.

Literaturverzeichnis

Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, Pirkko Sipila P (1998) Schizophrenia as a Long-Term Outcome of Pregnancy, Delivery, and Perinatal Complications: A 28-Year Follow-Up of the 1966 North Finland General Population Birth Cohort. *Am J Psychiatry* 155:355-64.

Kapur S, Remington G, Jones C, Wilson A, DaSilva J, Houle S, Zipursky R (1996) High levels of dopamine D2 receptor occupancy with low-dose haloperidol treatment: a PET study. *Am J Psychiatry* 153(7):948-50.

Kendler KS (1983) Overview: a current perspective on twin studies of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 140(11):1413-25.

Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophr Res.* 106(2-3):89-107.

Kety SS (1983) Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees: findings relevant to genetic and environmental factors in etiology. *Am J Psychiatry* 140(6):720-7.

Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. (2005) Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest* 115(6):1440-8.

Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, Hillmer A, Toncheva D, Owen MJ, O'Donovan MC (2009) A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Mol Psychiatry.* 14(8):796-803.

Kosower NS, Gerad L, Goldstein M, Parasol N, Zipser Y, Ragolsky M, Rozencwaig S, Elkabetz E, Abramovitch Y, Lerer B, Weizman A (1995) Constitutive heterochromatin of chromosome 1 and Duffy blood group alleles in schizophrenia. *Am J Med Genet* 60(2):133-8.

Literaturverzeichnis

Kraepelin E (1896) *Dementia praecox*. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, 5. Auflage, Barth, Leipzig.

Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279(5352):863-7.

Kumar R, Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64(5):310-9.

Law AJ, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Harrison PJ (2004) Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines. *Am J Psychiatry* 161(10):1848-55.

Love JM, Gudas LJ (1994) Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 6(6):825-31.

Lévesque D, Rouillard C. (2007) Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci* 30(1):22-30.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lönngqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoëga T, Helgason T (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73(1):34-48.

Literaturverzeichnis

Lien YJ, Liu CM, Faraone SV, Tsuang MT, Hwu HG, Hsiao PC, Chen WJ (2010) A genome-wide quantitative trait loci scan of neurocognitive performances in families with schizophrenia. *Genes Brain Behav* 9(7):695-702.

Liu CM, Hwu HG, Lin MW, Ou-Yang WC, Lee SF, Fann CS, Wong SH, Hsieh SH (2001) Suggestive evidence for linkage of schizophrenia to markers at chromosome 15q13-14 in Taiwanese families. *Am J Med Genet* 105(8):658-61.

Lobbestael J, Leurgans M, Arntz A (2011) Inter-rater reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) and Axis II Disorders (SCID II). *Clin Psychol Psychother* 18(1):75-9.

Ma G, He Z, Fang W, Tang W, Huang K, Li Z, He G, Xu Y, Feng G, Zheng T, Zhou J, He L, Shi Y (2008) The Ser9Gly polymorphism of the dopamine D3 receptor gene and risk of schizophrenia: an association study and a large meta-analysis. *Schizophr Res* 101(1-3):26-35.

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1994) in *Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine* von Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, 2nd edition, Raven Press, New York

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345(6272):224-9.

Martí SB, Cichon S, Propping P, Nöthen M (2002) Metabotropic glutamate receptor 3 (GRM3) gene variation is not associated with schizophrenia or bipolar affective disorder in the German population. *Am J Med Genet* 114(1):46-50.

Maxwell MA, Muscat GE (2006) The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002.

Literaturverzeichnis

McDonald C, Murphy KC. (2003) The new genetics of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 26(1):41-63.

McGue M, Gottesman II, Rao DC (1983) The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet* 35(6):1161-78.

McGuffin P, Farmer AE, Gottesman II, Murray RM, Reveley AM. (1984) Twin concordance for operationally defined schizophrenia. Confirmation of familiarity and heritability. *Arch Gen Psychiatry* 41(6):541-5.

McNeil TF, Cantor-Graae E, Weinberger DR. (2000) Relationship of obstetric complications and differences in size of brain structures in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157(2):203-12.

Meltzer HY (1991) The mechanism of action of novel antipsychotic drugs. *Schizophr Bull* 17(2):263-87.

Meyer C, Paulay G (2005) Cowrie Genetic Database Project; <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>

Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P (2001) Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6(3):293-301.

Moises HW, Yang L, Li T, Havsteen B, Fimmers R, Baur MP, Liu X, Gottesman II (1995) Potential linkage disequilibrium between schizophrenia and locus D22S278 on the long arm of chromosome 22. *Am J Med Genet* 60(5):465-7.

Möller H-J, Laux G, Kapfhammer H-P (1999) *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2. Auflage, Springer, Heidelberg

Literaturverzeichnis

Morris DW, Rodgers A, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP (2004) Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 125B(1):50-3.

Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262(4):56-61, 64-5.

Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, Wohlfahrt J, Ewald H, Mors O, Andersen PK, Melbye M (1999) Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *N Engl J Med* 340(8):603-8.

Muratake T, Fukui N, Kaneko N, Amagane H, Someya T (2005) Linkage disequilibrium in aquaporin 4 gene and association study with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 59(5):595-8.

Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E (2006) *Humangenetik*, Thieme, Stuttgart

Nau H, Blaner WS (1999) *Retinoids: The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

NCBI (National Center for Biotechnology Information), Entrez gene (2005)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>

Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperaviciute D, Gennarelli M, Strittmatter WJ, Bonvicini C, Rossi G, Jayathilake K, Cola PA, McEvoy JP, Keefe RS, Fisher EM, St Jean PL, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Ruppert A, Fraser G, Crombie C, Middleton LT, St Clair D, Roses AD, Muglia P, Francks C, Rujescu D, Meltzer HY, Goldstein DB (2009) A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet* 5(2):e1000373

Literaturverzeichnis

Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, Riley B, Paunio T, Pulver AE, Irmansyah, Holmans PA, Escamilla M, Wildenauer DB, Williams NM, Laurent C, Mowry BJ, Brzustowicz LM, Maziade M, Sklar P, Garver DL, Abecasis GR, Lerer B, Fallin MD, Gurling HM, Gejman PV, Lindholm E, Moises HW, Byerley W, Wijsman EM, Forabosco P, Tsuang MT, Hwu HG, Okazaki Y, Kendler KS, Wormley B, Fanous A, Walsh D, O'Neill FA, Peltonen L, Nestadt G, Lasseter VK, Liang KY, Papadimitriou GM, Dikeos DG, Schwab SG, Owen MJ, O'Donovan MC, Norton N, Hare E, Raventos H, Nicolini H, Albus M, Maier W, Nimgaonkar VL, Terenius L, Mallet J, Jay M, Godard S, Nertney D, Alexander M, Crowe RR, Silverman JM, Bassett AS, Roy MA, Mérette C, Pato CN, Pato MT, Roos JL, Kohn Y, Amann-Zalcenstein D, Kalsi G, McQuillin A, Curtis D, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Sanders AR, Duan J, Jazin E, Myles-Worsley M, Karayiorgou M, Lewis CM (2009) Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14(8):774-85.

Onstad S, Skre I, Torgersen S, Kringlen E (1991) Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 83(5):395-401.

O'Rourke DH, Gottesman II, Suarez BK, Rice J, Reich T (1982) Refutation of the general single-locus model for the etiology of schizophrenia. *Am J Hum Genet* 34(4):630-49.

Pennisi E (2007) Genomics. DNA study forces rethink of what it means to be a gene. *Science* 316(5831):1556-7.

Pierri JN, Volk CL, Auh S, Sampson A, Lewis DA. (2001) Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58(5):466-73.

Primer3 (2002) <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi>

Literaturverzeichnis

Pukrop R, Matuschek E, Ruhrmann S, Brockhaus-Dumke A, Tendolkar I, Bertsch A, Klosterkötter J (2003) Dimensions of working memory dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Res* 62(3):259-68.

Pulver AE, Karayiorgou M, Wolyniec PS, Lasseter VK, Kasch L, Nestadt G, Antonarakis S, Housman D, Kazazian HH, Meyers D, et al. (1994) Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: Part 1. *Am J Med Genet* 54(1):36-43.

Pulver AE, Lasseter VK, Kasch L, Wolyniec P, Nestadt G, Blouin JL, Kimberland M, Babb R, Vourlis S, Chen H, et al. (1995) Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes. *Am J Med Genet* 60(3):252-60.

QIAamp DNA Blood Midi/ Maxi Handbook (2001) Firma Qiagen, Hilden

Rabinowitz J, Lichtenberg P, Kaplan Z, Mark M, Nahon D, Davidson M. (2001) Rehospitalization rates of chronically ill schizophrenic patients discharged on a regimen of risperidone, olanzapine, or conventional antipsychotics. *Am J Psychiatry* 158(2):266-9.

Rehm H, Hammar F (2007) *Biochemie light*, Harri Deutsch Verlag, Frankfurt

Réthelyi JM, Bakker SC, Polgár P, Czobor P, Strengman E, Pásztor PI, Kahn RS, Bitter I (2010) Association study of NRG1, DTNBP1, RGS4, G72/G30, and PIP5K2A with schizophrenia and symptom severity in a Hungarian sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(3):792-801.

Reynolds GP, Beasley CL, Zhang ZJ (2002) Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J Neural Transm* 109(5-6):881-9.

Literaturverzeichnis

Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI Jr, Schuckit MA, Begleiter H (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence, *Alcohol Clin Exp Res* 19(4):1018-23.

Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin DY, Duan J, Ophoff RA, Andreassen OA, Scolnick E, Cichon S, St Clair D, Corvin A, Gurling H, Werge T, Rujescu D, Blackwood DH, Pato CN, Malhotra AK, Purcell S, Dudbridge F, Neale BM, Rossin L, Visscher PM, Posthuma D, Ruderfer DM, Fanous A, Stefansson H, Steinberg S, Mowry BJ, Golimbet V, De Hert M, Jönsson EG, Bitter I, Pietiläinen OP, Collier DA, Tosato S, Agartz I, Albus M, Alexander M, Amdur RL, Amin F, Bass N, Bergen SE, Black DW, Børglum AD, Brown MA, Bruggeman R, Buccola NG, Byerley WF, Cahn W, Cantor RM, Carr VJ, Catts SV, Choudhury K, Cloninger CR, Cormican P, Craddock N, Danoy PA, Datta S, de Haan L, Demontis D, Dikeos D, Djurovic S, Donnelly P, Donohoe G, Duong L, Dwyer S, Fink-Jensen A, Freedman R, Freimer NB, Friedl M, Georgieva L, Giegling I, Gill M, Glenthøj B, Godard S, Hamshere M, Hansen M, Hansen T, Hartmann AM, Henskens FA, Hougaard DM, Hultman CM, Ingason A, Jablensky AV, Jakobsen KD, Jay M, Jürgens G, Kahn RS, Keller MC, Kenis G, Kenny E, Kim Y, Kirov GK, Konnerth H, Konte B, Krabbendam L, Krasucki R, Lasseter VK, Laurent C, Lawrence J, Lencz T, Lerer FB, Liang KY, Lichtenstein P, Lieberman JA, Linszen DH, Lönngqvist J, Loughland CM, Maclean AW, Maher BS, Maier W, Mallet J, Malloy P, Mattheisen M, Mattingsdal M, McGhee KA, McGrath JJ, McIntosh A, McLean DE, McQuillin A, Melle I, Michie PT, Milanova V, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Moskvina V, Muglia P, Myin-Germeys I, Nertney DA, Nestadt G, Nielsen J, Nikolov I, Nordentoft M, Norton N, Nöthen MM, O'Dushlaine CT, Olincy A, Olsen L, O'Neill FA, Orntoft TF, Owen MJ, Pantelis C, Papadimitriou G, Pato MT, Peltonen L, Petursson H, Pickard B, Pimm J, Pulver AE, Puri V, Quested D, Quinn EM, Rasmussen HB, Réthelyi JM, Ribble R, Rietschel M, Riley BP, Ruggeri M, Schall U, Schulze TG, Schwab SG, Scott RJ, Shi J, Sigurdsson E, Silverman JM, Spencer CC, Stefansson K, Strange A, Strengman E, Stroup TS, Suvisaari J, Terenius L, Thirumalai S, Thygesen JH, Timm S, Toncheva D, van den Oord E, van Os J, van Winkel R, Veldink J, Walsh D, Wang AG, Wiersma D, Wildenauer DB, Williams HJ, Williams NM, Wormley B, Zammit S, Sullivan

Literaturverzeichnis

PF, O'Donovan MC, Daly MJ, Gejman PV; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium (2011) Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 43(10):969-76.

Risch N (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 46(2):222-8.

Romeo S, Menzaghi C, Bruno R, Sentinelli F, Fallarino M, Fioretti F, Filetti S,1, Balsamo A, Di Mario U, Baroni MG (2004) Search for Genetic Variants in the Retinoid X Receptor-g Gene by Polymerase Chain Reaction-Single-Strand Conformation Polymorphism in Patients with Resistance to Thyroid Hormone without Mutations in Thyroid Hormone Receptor b Gene. *Thyroid* Volume 14, Number 5

Rosenthal D, Kety SS (1968) *The Transmission of Schizophrenia*, Pergamon Press, New York

Ruano D, Macedo A, Dourado A, Soares MJ, Valente J, Coelho I, Santos V, Azevedo MH, Goodman A, Hutz MH, Gama C, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Palha JA (2004) NR4A2 and schizophrenia: lack of association in a Portuguese/Brazilian study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 128B(1):41-5.

Rujescu D (2010) in *Schizophrenie – Zukunftsperspektiven in Klinik und Forschung* von Möller HJ, Müller N, Springer, Wien, New York

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-4.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-491.

Literaturverzeichnis

Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E (1997) Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26):14349-54.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. in *Molecular cloning. A laboratory manual*. von Sambrook J, Russell DW, Vol. 2, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Schneider K (1980) *Klinische Psychopathologie*, 12. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Schwab SG, Albus M, Hallmayer J, Hönig S, Borrmann M, Lichtermann D, Ebstein RP, Ackenheil M, Lerer B, Risch N, Maier W, Wildenauer DB (1995) Evaluation of a susceptibility gene for schizophrenia on chromosome 6p by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Nat Genet* 11(3):325-7.

Schwab SG, Eckstein GN, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Lichtermann D, Ertl MA, Maier W, Wildenauer DB (1997) Evidence suggestive of a locus on chromosome 5q31 contributing to susceptibility for schizophrenia in German and Israeli families by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Mol Psychiatry* 2(2):156-60.

Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, Lerer B, Hanses C, Kanyas K, Segman R, Borrmann M, Dreikorn B, Lichtermann D, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (1998) Further evidence for a susceptibility locus on chromosome 10p14-p11 in 72 families with schizophrenia by nonparametric linkage analysis. *Am J Med Genet* 81(4):302-7.

Schwab SG, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Hönig S, Strauss M, Segman R, Lichtermann D, Knapp M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (1998) Support for a chromosome 18p locus conferring susceptibility to functional psychoses in families with schizophrenia, by association and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 63(4):1139-52.

Literaturverzeichnis

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72(1):185-90.

Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ, Olincy A, Amin F, Cloninger CR, Silverman JM, Buccola NG, Byerley WF, Black DW, Crowe RR, Oksenberg JR, Mirel DB, Kendler KS, Freedman R, Gejman PV (2009) Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460(7256):753-7.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisanté-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A (2002) A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(6):1296-302.

So HC, Chen RY, Chen EY, Cheung EF, Li T, Sham PC (2008) An association study of RGS4 polymorphisms with clinical phenotypes of schizophrenia in a Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(1):77-85.

Sokol DK, Moore CA, Rose RJ, Williams CJ, Reed T, Christian JC. (1995) Intrapair differences in personality and cognitive ability among young monozygotic twins distinguished by chorion type. *Behav Genet* 25(5):457-66.

Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, Sieghart WC, Meszaros K, Fathi N, Laurent C, Mallet J, Macciardi F, Pedrini S, Gill M, Hawi Z, Gibson S, Jazin EE, Yang HT, Adolfsson R, Pato CN, Dourado AM, Owen MJ (1998) European Multicentre Association Study of Schizophrenia: a study of the DRD2 Ser311Cys and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *Am J Med Genet* 81(1):24-8.

Literaturverzeichnis

Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Børglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Böttcher Y, Olesen J, Breuer R, Möller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Réthelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemenev LA; Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP), Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jönsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson H, Nöthen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256):744-7.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002) Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71:877-92

Strachan T und Read AP (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human

Literaturverzeichnis

ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(2):337-48.

Straub RE, MacLean CJ, Martin RB, Ma Y, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Webb BT, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (1998) A schizophrenia locus may be located in region 10p15-p11. *Am J Med Genet* 81(4):296-301.

Straub RE, MacLean CJ, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (1997) Support for a possible schizophrenia vulnerability locus in region 5q22-31 in Irish families. *Mol Psychiatry* 2(2):148-55.

Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA (2006) Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188:510-8.

Structural Genomics Consortium (SGC) (2010) <http://www.thesgc.org/structures>

Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Børglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Böttcher Y, Olesen J, Breuer R, Möller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Réthelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemeny LA; Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP), Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jönsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson H, Nöthen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St

Literaturverzeichnis

Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256):744-7.

Smith MJ, Cloninger CR, Harms MP, Csernansky JG (2008) Temperament and character as schizophrenia-related endophenotypes in non-psychotic siblings. *Schizophr Res* 104(1-3):198-205.

Strohmaier J, Frank J, Wendland JR, Schumacher J, Jamra RA, Treutlein J, Nieratschker V, Breuer R, Mattheisen M, Herms S, Mühleisen TW, Maier W, Nöthen MM, Cichon S, Rietschel M, Schulze TG (2010) A reappraisal of the association between Dysbindin (DTNBP1) and schizophrenia in a large combined case-control and family-based sample of German ancestry. *Schizophr Res* 118(1-3):98-105.

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12):1187-92.

Sweet RA, Pierri JN, Auh S, Sampson AR, Lewis DA (2003) Reduced pyramidal cell somal volume in auditory association cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 28(3):599-609.

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 102(1-3):1-18.

Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110(1-3):1-23.

The GeneCards Human Gene Database (2011) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RXRG>

Literaturverzeichnis

Tienari P, Wynne LC, Läksy K, Moring J, Nieminen P, Sorri A, Lahti I, Wahlberg KE (2003) Genetic boundaries of the schizophrenia spectrum: evidence from the Finnish Adoptive Family Study of Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160(9):1587-94.

Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH, Takada S (2007) The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol* 27(5):1844-58.

Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH, Bahn S (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 362(9386):798-805.

Tsuang M (2000) Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry* 47(3):210-20.

Turetsky BI, Greenwood TA, Olincy A, Radant AD, Braff DL, Cadenhead KS, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Light GA, Mintz J, Nuechterlein KH, Schork NJ, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Calkins ME (2008a) Abnormal auditory N100 amplitude: a heritable endophenotype in first-degree relatives of schizophrenia probands. *Biol Psychiatry* 64(12):1051-9.

Turetsky BI, Kohler CG, Gur RE, Moberg PJ (2008b) Olfactory physiological impairment in first-degree relatives of schizophrenia patients. *Schizophr Res* 102(1-3):220-9.

U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, Health & Human Services

Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI (2004) Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* 67(2-3):269-75.

Literaturverzeichnis

Utsunomiya K, Shinkai T, De Luca V, Hwang R, Sakata S, Fukunaka Y, Chen HI, Ohmori O, Nakamura J (2008) Genetic association between the dopamine D3 gene polymorphism (Ser9Gly) and schizophrenia in Japanese populations: evidence from a case-control study and meta-analysis. *Neurosci Lett* 444(2):161-5.

Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 2003 146(1-2):3-17.

Volkenandt M, Lohr M, and Dicker AP (1990) [Gene amplification by the polymerase chain reaction]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 115 (17):670-676.

Wang S, Sun CE, Walczak CA, Ziegler JS, Kipps BR, Goldin LR, Diehl SR (1995) Evidence for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6pter-p22. *Nat Genet* 10(1):41-6.

Wang H, Chu W, Hemphill C, Hasstedt SJ, Elbein SC (2002) Mutation screening and association of human retinoid X receptor gamma variation with lipid levels in familial type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 76(1):14-22.

Westergaard T, Mortensen PB, Pedersen CB, Wohlfahrt J, Melbye M (1999) Exposure to prenatal and childhood infections and the risk of schizophrenia: suggestions from a study of sibship characteristics and influenza prevalence. *Arch Gen Psychiatry* 56(11):993-8.

World Health Organisation (WHO) (2006) *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)-10*

Williams J, McGuffin P, Nöthen M, Owen MJ (1997) Meta-analysis of association between the 5-HT2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia. EMAS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet.* 349(9060):1221.

Literaturverzeichnis

Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L, Cardno A, Asherson P, Blackwood D, Muir W, Meszaros K, Aschauer H, Mallet J, Laurent C, Pekkarinen P, Seppala J, Stefanis CN, Papadimitriou GN, Macciardi F, Verga M, Pato C, Azevedo H, Crocq MA, Gurling H, Owen MJ, et al. (1998) A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3(2):141-9.

Wittchen HU, Zaudig M, Fydrich T (1997). *SKID. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV. Achse I und II. Handanweisung*. Hogrefe, Göttingen

Wohl M, Gorwood P (2007) Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *Eur Psychiatry* 22(1):22-6.

Woodruff PW, McManus IC, David AS (1995) Meta-analysis of corpus callosum size in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:457-461.

Wolf RC (2006) Das Arbeitsgedächtnis in der Schizophrenie: Überblick und Ausblick. *Fortschr Neurol Psychiat* 74(8):449-468.

Woods BT (1998) Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry* 155(12):1661-70.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET (2000) Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157(1):16-25.

Xing G, Zhang L, Russell S, Post R (2006) Reduction of dopamine-related transcription factors Nurr1 and NGFI-B in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res* 84(1):36-56.

Literaturverzeichnis

Yoshikawa T (2003) Distribution of haplotypes derived from three common variants of the NR4A2 gene in Japanese patients with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 118B(1):20-4.

Zetterström RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11(2):407-16.

Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G, Pfahl M (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355(6359):441-6.

Zheng C, Shen Y, Xu Q (2012) Rs1076560, a functional variant of the dopamine D2 receptor gene, confers risk of schizophrenia in Han Chinese. *Neurosci Lett* 518(1):41-4.

Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT (2000) Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study. *Am J Psychiatry* 157(2):196-202.

I Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Falkai und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller danke ich dafür, daß ich die vorliegende Arbeit in der von ihnen geleiteten Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München absolvieren konnte.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu und Frau Dr. Ina Giegling für die Auswahl, Vergabe und Durchführung der vorliegenden Arbeit in ihrer Forschungsgruppe. Sie haben als langjährige geduldige Ansprechpartner mein Interesse an der Psychiatrie und speziell der Neurogenetik entfacht und mich umfassend unterstützt.

Eine sehr große Hilfe war mir Frau Dr. Annette Hartmann. Ich möchte mich bedanken für die kompetente und durchgehende Betreuung bei labortechnischer Durchführung, genetischer Auswertung und abschließender schriftlicher Korrektur.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Labors, die für gute Stimmung sorgten und bei Problemen zur Seite standen, wobei unter anderem Dr. Claudia Gonnermann, die mich anfänglich in die Laborabläufe einweihte, und Dr. Julian Kalasch, mit dem ich die meiste Zeit Schulter an Schulter im Labor verbrachte, zu erwähnen sind.

Außerdem bedanke ich mich bei Peter Böhme, der mir bei Schwierigkeiten in der EDV behilflich war, bei Fritz Krautzberger für die letztmalige orthographische Durchsicht und bei meiner Familie für die langjährige Unterstützung, insbesondere bei meiner Frau Carolin Sperber.